

Untersuchungen zum Mechanismus und zur Regulation der Transcription

Hermann Rohrer

1976

Untersuchungen zum Mechanismus
und zur Regulation der Transcription



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Untersuchungen zum Mechanismus und zur Regulation der Transcription

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hermann Rohrer
aus Friedrichshafen

München 1976



1. Berichterstatter: Professor Dr. W. Zillig
2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Juli 1976

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. W. Zillig am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, durchgeführt.

Herrn Professor Zillig danke ich sehr herzlich für die großzügige Förderung der Arbeit.

Der Max-Planck-Gesellschaft danke ich für ein Promotionsstipendium.

Meinen lieben Eltern

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
A EINLEITUNG	1
B ERGEBNISSE UND DISKUSSION	5
I. <u>Regulation der Genexpression beim Bakteriophagen T4</u>	5
1. Einleitung	5
2. Alteration der RNA-Polymerase aus E. coli	8
2.1. Einführung	8
2.2. Isolierung des Alterationsenzym	10
2.2.1. Vorversuch	10
2.2.2. Verlauf der Reinigung des Enzyms	12
2.3. Physikalische Eigenschaften des Enzyms	14
2.4. Reaktionsbedingungen	17
2.5. <u>In vitro</u> -Alteration von RNA-Polymerase und anderen Proteinen	23
2.5.1. Normale RNA-Polymerase	24
2.5.2. Modifizierte RNA-Polymerase	29
2.5.3. Andere Proteine	32
2.6. Analyse der Alterationsreaktion	35
2.6.1. Struktur des übertragenen Restes	35
2.6.2. Bindung zwischen ADP-Ribose und Protein	45
2.7. Alterationsgen	49
2.8. Nachweis des Alterationsenzym in T4-infi- zierten Zellen	52
2.9. Transcriptionseigenschaften der alterierten Polymerase	57
2.10. Funktion der Alteration	60

	Seite
II. <u>Struktur des ternären Elongationskomplexes</u>	65
1. Einleitung	65
2. Untersuchung von Elongationskomplexen an verschiedenen Matrizen	67
2.1. Ternärer Elongationskomplex an T7-DNA	67
2.1.1. Isolierung des ternären Elongationskomplexes an T7-DNA	67
2.1.2. Stabilität des isolierten ternären Elongationskomplexes	72
2.1.3. Isolierung des DNase- und RNase-resistenten ternären Elongationskomplexes	74
2.1.4. Bestimmung der Länge von DNA und RNA im Nuclease-resistenten Elongationskomplex	76
2.1.5. Bestimmung des Verhältnisses von DNA zu RNA im Nuclease-resistenten Elongationskomplex	81
2.1.6. Nachweis von einzelsträngigen Bereichen in der DNA des ternären Elongationskomplexes	82
2.1.6.1. Einleitung	82
2.1.6.2. Bedingungen der Hydrolyse von ternärem Elongationskomplex mit einzelstrangspezifischer Nuclease	84
2.1.6.3. Abhängigkeit des Anteils einzelsträngiger DNA von der Anzahl ternärer Komplexe pro DNA-Molekül	87
2.1.6.4. Versuch des Nachweises einzelsträngiger Bereiche in der DNA des Bindungskomplexes	94
2.2. Ternärer Elongationskomplex an Poly(dA) (dT)	95
2.2.1. Einleitung	95
2.2.2. Isolierung des Elongationskomplexes an Poly(dA) (dT) und Nachweis einzelsträngiger Bereiche in der DNA des Komplexes	97

2.2.3. Identifizierung der beim endonucleolytischen Abbau des ternären Komplexes freigesetzten Nucleotide	99
2.2.4. Bestimmung des Verhältnisses von codogenem zu nicht-codogenem DNA-Strang im Nuclease-resistenten ternären Komplex	101
2.3. Isolierung des ternären Elongationskomplexes an T5-DNA	103
2.4. Modell des Elongationskomplexes	105
C MATERIAL UND METHODEN	108
I. MATERIAL	108
1. Substanzen	108
2. Lösungen	
II. METHODEN	110
1. Präparative Methoden	110
a. Isolierung des Alterationsenzym	110
b. Anreicherung des Alterationsenzym aus T4-präinfizierten Zellen	110
c. Gewinnung von Rohextrakten aus T4-präinfizierten Zellen	111
d. Isolierung von ADP-ribosyliertem Lysozym und Poly-L-Arginin	111
e. Zucht und Reinigung der Bakteriophagen T4 und T7	112
f. Isolierung der Phagen-DNA	112
g. Präparation von ³ H-markiertem Poly(dA) (dT)	112
h. Isolierung der RNA-Polymerase aus E. coli	113
i. Isolierung des ternären Elongationskomplexes an T7-DNA	113
j. Isolierung des ternären Elongationskomplexes an Poly(dA) (dT)	113

k. Isolierung des DNase- und RNase-resistenten Elongationskomplexes an T7-DNA	114
l. Isolierung des DNase- und RNase-resistenten Elongationskomplexes an T5-DNA	114
2. Quantitative Bestimmungsmethoden	115
a. DNA-Bestimmung	115
b. Protein-Bestimmung	115
c. Radioaktivitäts-Bestimmung	115
d. RNA-Synthesetest	116
e. Test der Alterationsreaktion (Standardtest)	116
f. Endonuclease-Test	116
3. Analytische Methoden	117
a. Dünnschichtchromatographische Methoden	117
b. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	117
c. Bestimmung der Kettenlänge von DNA und RNA im Nuclease-resistenten Komplex an T7-DNA	117
d. Identifizierung der aus Elongationskomplex an Poly(dA) (dT) durch die Endonuclease frei- gesetzten Nucleotide	118
e. Identifizierung der Nucleotide im Nuclease- resistenten Komplex an Poly(dA) (dT)	118
f. Test der ADP-Ribosylierung von RNA-Polymerase, Histon Fl, Salmin Al, Poly-L-Lysin, Poly-L- Arginin und anderer Proteine	119
D ZUSAMMENFASSUNG	121
E LITERATURVERZEICHNIS	124

VORBEMERKUNG

Um die Darstellung der Ergebnisse von der Diskussion optisch abzutrennen, wird die Beschreibung der Resultate im Text von "Ergebnisse und Diskussion" jeweils eingerückt.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

DNA	Desoxyribonucleinsäure
T4-DNA	Desoxyribonucleinsäure des Bakteriophagen T4
T7-DNA	Desoxyribonucleinsäure des Bakteriophagen T7
RNA	Ribonucleinsäure
m-RNA	Messenger-RNA (Boten-RNA)
t-RNA	Aminotransfer-RNA (s-RNA, lösliche RNA)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
UTP	Uridin-5'-triphosphat
RNAse	Ribonuclease
DNase	Desoxyribonuclease
E	DNA-abhängige PNA-Polymerase, nicht gesättigt mit dem Initiationsfaktor σ (Minimalenzym)
E σ	Vollenzym, Holoenzym
SDS	Natriumdodecylsulfat
EDTA	Aethylendiamintetraessigsäure
Upm	Umdrehungen pro Minute
TCA	Trichloressigsäure
DEAE-Cellulose	Diäthyl-aminoäthyl-Cellulose
Tris	Tris-Oxymethyl-aminomethan
BSA	Rinderserumalbumin
MOI	Multiplizität der Infektion
PFU	Plaque-bildende-Einheit(en)
cpm	Impulse pro Minute (gemessene)
Ci	Curie
PPO	2,5-Diphenyloxazol
POPOP	1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyloxazolyl)-Benzol
OD	Optische Dichte
NAD ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, oxydiert
NMN	Nicotinamid-mononucleotid
dTTP	2'-Desoxy-thymidin-5'-triphosphat
dATP	2'-Desoxy-adenosin-5'-triphosphat
dTMP	2'-Desoxy-thymidin-5'-monophosphat
dAMP	2'-Desoxy-adenosin-5'-monophosphat
Poly (dA) (dT)	Poly-desoxy-adenylsäure. Poly-desoxy-thymidylsäure
dGMP	2'-Desoxy-guanosin-5'-monophosphat
dCMP	2'-Desoxy-cytidin-5'-monophosphat

A EINLEITUNG

Seit den Arbeiten von Gregor Mendel 1865 wissen wir, daß die Information für verschiedene Merkmale eines Organismus unabhängig voneinander auf die Nachkommen vererbt werden. Durch die klassische Genetik wurde gezeigt, daß die genetische Information für die Merkmale linear auf den Chromosomen der Zelle angeordnet ist, und daß die Information durch diese Chromosomen von den Eltern auf die Nachkommen weitergegeben wird. Die Teilinformation für ein Merkmal wurde "Gen" genannt. Chromosomen bestehen aus Ribonucleinsäure (RNA), Desoxyribonucleinsäure (DNA) und Protein. Die Experimente von Griffith (1), Avery (2) und Hershey und Chase (3) erbrachten den Nachweis, daß die Desoxyribonucleinsäure der Träger der genetischen Information ist.

Nachdem die Strukturaufklärung der DNA durch Watson und Crick (4) 1953 den entscheidenden Durchbruch zum Verständnis der Mechanismen der Weitergabe genetischer Information erbracht hatte, wurde in den folgenden Jahren das Prinzip der Genausprägung, das "zentrale Dogma" (5) der Molekulargenetik, erarbeitet: "Die Information wird von der DNA an ein ähnliches Molekül, die Messenger-RNA (m-RNA), weitergegeben, und von dieser Kopie wird die Information in die Aminosäuresequenz eines Proteins übersetzt. Die Überschreibung der DNA in m-RNA wird Transcription, die Übersetzung der m-RNA in Proteine wird Translation genannt.

Die DNA ist kettenförmig aus 4 Nucleotiden dAMP, dCMP, dGMP und dTMP aufgebaut. Zwei Polynucleotidketten sind jeweils schraubenförmig umeinander gewunden, und bilden eine Doppelspirale, in deren Zentrum die Basen der Nucleotide durch spezifische Wasserstoffbrücken miteinander gekoppelt sind.

Die Reihenfolge der Aminosäuren aller Proteine wird durch die Sequenz der Nucleotide des DNA-Moleküls bestimmt, durch den sogenannten genetischen Code. Eine Folge von 3 Nucleotiden in der DNA, das Codon, definiert jeweils eine bestimmte Aminosäure im Genprodukt Protein.

Die Überschreibung, oder Transcription, der DNA auf die Matrize m-RNA, wird durch das Enzym RNA-Polymerase katalysiert. Nach der Entdeckung des Enzyms 1959 in Leberkernen (6) und Bakterien (7), wurde in der Folgezeit die RNA-Polymerase aus *Escherichia coli* am intensivsten untersucht. Die RNA-Polymerase heftet sich an die DNA und verknüpft die Bausteine ATP, CTP, GTP, UTP unter Freisetzung von Pyrophosphat, zu RNA-Ketten, die zu dem codogenen DNA-Strang komplementär sind.

Die von der RNA-Polymerase katalysierte Reaktion kann in vier zeitlichen aufeinanderfolgende Teilschritte aufgespaltert werden:

1. Bindung der RNA-Polymerase an die DNA.
2. Initiation, Schritte zwischen Bindung und Verknüpfung von ATP oder GTP mit einem zweiten Ribonucleosid-triphosphat.
3. Elongation, die Verlängerung der RNA-Kette.
4. Termination, das Ende der RNA-Synthese.

Die DNA diktiert nicht nur die Reihenfolge der Nucleotide in der RNA, sondern legt außerdem fest, an welchen Orten auf der DNA die RNA-Polymerase mit dem Aufbau einer RNA-Kette beginnen kann, und an welchen Stellen sie die Synthese beenden muß. Die Bindung der RNA-Polymerase an die DNA führt zur selektiven Erkennung einer Region des DNA-Moleküls, die Promotor genannt wird, und den Initiationspunkt der RNA-Synthese enthält. In der Sequenz der Nucleotide des Promotors ist nicht nur das Erkennungssignal für die Initiation, sondern auch die Information enthalten, welcher der beiden antiparallelen DNA-Stränge als codogener Strang transkribiert wird. Die Anordnung von Promotoren und Terminationsstellen definiert die Einheiten der Transcription.

Es ist für die Zelle ein Gebot der Ökonomie, immer nur dann, wenn ein Genprodukt benötigt wird, die entsprechende Region durch die RNA-Polymerase zu überschreiben. In einer bestimmten Situation ist deshalb von den vielen Promotoren auf einer *E. coli*-DNA, die ca. 10^4 Gene trägt, nur ein bestimmter Anteil tatsächlich für die Polymerase zugänglich. Die Regulation der Genexpression stellt neben der schnellen allosterischen Kontrolle von Enzymen einen zweiten Steuerungsmechanismus der Zelle dar, mit dem der Syntheseapparat der Zelle der jeweiligen Situation angepaßt wird.

Wie von Jacob und Monod 1961 (8) postuliert wurde, und in den folgenden Jahren an vielen Beispielen bewiesen werden konnte, blockieren Repressorproteine bestimmte Startstellen der RNA-Polymerase, und schalten somit diese Gene aus. Wird das betreffende Genprodukt von der Zelle benötigt, so werden die Repressoren durch bestimmte Geninduktoren, z.B. durch die Substrate dieser Genprodukte von den Promotoren abgelöst. Neben dieser negativen Kontrolle der Genexpression gibt es auch das Phänomen der positiven Kontrolle (9), daß ein Protein an eine dem Promotor benachbarte Stelle bindet, und zur verstärkten Transcription dieses Gens führt. Bei beiden Kontrollmechanismen wird der Zugang der Transcriptase zur Information auf der DNA beeinflußt, während die RNA-Polymerase selbst nicht verändert wird.

Von dieser Möglichkeit, die RNA-Polymerase direkt zu verändern, und auf diese Weise die Transcriptionsselektivität zu beeinflussen, macht der Bakteriophage T4 bei der Infektion von *E. coli*-Bakterien Gebrauch (10). In zwei voneinander unabhängigen Prozessen, Alteration und Modifikation, werden nach der Infektion niedermolekulare Verbindungen kovalent mit der α -Untereinheit der RNA-Polymerase der infizierten Zelle verknüpft.

Die Analyse des Alterationsvorgangs, und der chemischen Struktur der eingeführten Gruppe, ist der Gegenstand des ersten Teils der vorliegenden Arbeit.

Das Thema des zweiten Teils der Arbeit ist die Struktur des ternären Elongationskomplexes, der aus DNA, RNA-Polymerase und der wachsenden RNA-Kette besteht.

Die zur korrekten RNA-Synthese erforderliche Basenpaarung zwischen den Basen der DNA und den Basen der Ribonucleosidtriphosphate kann theoretisch auf zwei völlig verschiedene Arten ermöglicht werden.

Nach der ersten Vorstellung bleibt die Doppelhelixstruktur der DNA erhalten und die Substratnucleotide werden in einer der DNA-Rillen durch spezifische Wasserstoffbrücken zu den DNA-Basen aneinandergereiht. Über einen gewissen Bereich bildet sich eine Tripelhelix aus.

Nach der zweiten Hypothese wird die DNA-Doppelhelix durch die RNA-Polymerase lokal aufgeschmolzen, die DNA-Stränge sind über eine bestimmte Länge voneinander getrennt und die Ribonucleosidtriphosphate bilden Wasserstoffbrücken zu dem freien codogenen DNA-Strang aus.

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wird das zweite Modell sehr stark unterstützt. Die erste Annahme kann ausgeschlossen werden.

B ERGEBNISSE UND DISKUSSION

I. Regulation der Genexpression beim Bakteriophagen T4

1. Einleitung

Der Bakteriophage T4 ist ein großes, virulentes Virus (MW 2.2×10^8) das einen komplexen Aufbau zeigt. Es besteht aus einem hexagonalen Kopf, in dem die zirkulär permutierte und terminal repetitive DNA verpackt ist, und dem daran sitzenden Schwanz, der mit seiner Basalplatte und den Schwanzfibern für die Anheftung des Phagen an die Bakterienzelle verantwortlich ist. Obwohl auf der DNA des Phagen bis heute rund 120 Gene kartiert wurden, ist die Genkarte nur zu 60% gesättigt. Dem komplexen Aufbau des Phagen entspricht ein komplexer Ablauf der Infektion, der im Folgenden kurz beschrieben werden soll.

Nach der Anheftung des Phagen an die Bakterienzellwand injiziert er seine DNA in die Wirtszelle. Damit beginnt eine zeitlich genau regulierte Abfolge von Reaktionen, die dazu führt, daß der Syntheseapparat der Wirtszelle so verändert wird, daß er nach der Infektion ausschließlich zur Vermehrung des Bakteriophagen dient.

Es ist seit langem bekannt, daß der Bakteriophage T4 die DNA-, RNA- und Proteinsynthese des Wirtsbakteriums hemmt (11). In den letzten Jahren wurde die wirtsabhängige DNA-, RNA- und Proteinsynthese unmittelbar nach der Infektion untersucht. Es stellte sich heraus, daß die DNA-Synthese etwa 1 Minute nach der Infektion völlig zum Stillstand kommt (12). Das Ausmaß der RNA-Synthese an der DNA der infizierten Zelle sinkt in der ersten Minute bis auf wenige Prozent der RNA-Synthese uninfizierter Zellen ab. Bis 3-5 Minuten nach Infektion kann diese geringe RNA-Synthese nachgewiesen werden (13, 14).

Der erste rasche Abfall der DNA-, m-PNA- und Proteinsynthese des Wirtsbakteriums wird durch das Virus bewirkt, ohne daß dazu die Synthese eines Virus-codierten Proteins erforderlich ist (15,16). An der RNA-Polymerase der befallenen Zelle treten - ebenfalls in Abwesenheit von Proteinsynthese - sofort nach Infektion strukturelle Veränderungen auf (10,17, 18). Aus diesem Grunde wurde vermutet, daß ein Zusammenhang existiert zwischen dieser Alteration der RNA-Polymerase und dem Abschalten der Nucleinsäuresynthese des Wirtsbakteriums.

Die vollständige Hemmung der m-PNA-Synthese und die Abschaltung der Synthese der stabilen RNA-Klassen (t-PNA, r-PNA) erfordert die Ausprägung eines oder mehrerer Phagengene (14, 18,19).

Parallel zur Abschaltung der wirtsspezifischen RNA-Synthese beginnt die Transcription verschiedener Klassen von T4-Genen (20,21,22,23). Man unterscheidet "frühe" Gene ("early"), die in den ersten 6 Minuten von der RNA-Polymerase am L-Strang der T4-DNA abgelesen werden, "späte" Gene die erst nach der Replikation der T4-DNA, also ab 10 Minuten nach Infektion exprimiert werden, und "Quasi-späte" Gene, die in geringem Ausmaß vor der Replikation, jedoch vor allem nach der Replikation ausgeprägt werden. Die späten Gene werden vom R-Strang der T4-DNA abgelesen.

Die "frühen" Gene kann man in 2 Genklassen unterteilen: Die "immediate early" Gene werden sofort nach Infektion ausgeprägt, während die "delayed early" Gene, welche in vielen Fällen hinter den "immediate early" Genen auf der DNA angeordnet sind, erst 1-2 Minuten nach Infektion abgelesen werden. Die "delayed early" RNA kann durch Verlängerung der "immediate early" RNA-Kette oder durch Initiation der RNA-Polymerase an "delayed early" Promotoren ("middle" Promotoren) entstehen (24).

Diese komplexe Regulation der Genexpression nach Infektion könnte durch verschiedene Mechanismen erreicht werden, wie zum Beispiel durch Veränderungen der DNA-Struktur, durch phagen-

spezifische Regulationsproteine, die mit der DNA oder der Transcriptase in Wechselwirkung treten, durch Modifikation der RNA-Polymerase, oder indem die Polymerase durch ein phagenspezifisches Enzym ersetzt wird.

Während die letztere Möglichkeit bei der Infektion durch die Bakteriophagen T3 und T7 verwirklicht worden ist (25,26), hat man in T4-infizierten Zellen beobachtet, daß die RNA-Polymerase des Wirts zunächst alteriert und danach durch ein in der Zelle synthetisiertes, phagenspezifisches Protein modifiziert wird (27,28,29). Die modifizierte Polymerase wird bis zum Ende des Infektionsprozesses zur Expression der Phagengene verwendet (30).

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, daß in der Modifikationsreaktion ein Adenin und zwei Phosphate, wahrscheinlich in Form eines ADP-Piboserestes, mit einer basischen Aminosäure in der α -Untereinheit der RNA-Polymerase kovalent verknüpft werden (31,29,32). Da die modifizierte RNA-Polymerase bestimmte E. coli Gene nicht mehr transkribieren kann, wird vermutet, daß die Modifikation zur Hemmung der wirtsabhängigen RNA-Synthese beiträgt (33).

Das Abschalten der Transkription vieler "früher" Gene ist an die Replikation der T4-DNA gekoppelt. Außerdem wurde ein verstärkter Abbau von m-RNA-Ketten dieser Gene beobachtet.

Nach dem Beginn der Replikation werden dann die "späten" T4 Gene transkribiert. Dazu ist nicht nur das Ablaufen der DNA-Replikation sondern die Anwesenheit von drei phagenspezifischen Proteinen erforderlich, die sehr fest an die RNA-Polymerase binden. Die bereits modifizierte RNA-Polymerase wird durch diese Produkte der T4-Gene 33,45 und 55 in ihrer Spezifität so verändert, daß sie nun in der Lage ist, an replizierender DNA des Phagen die späten Gene abzulesen. Da DNA-Einzelstrangbrüche und kurze RNA-Stücke, die als Hybrid mit einem DNA-Strang vorliegen, charakteristisch für replizierende DNA sind, wird vermutet, daß die Polymerase an den 3'-OH Enden der DNA- oder RNA-Stücke mit der Synthese der RNA beginnt (24).

Nachdem in der "frühen" Phase der Infektion Gene ausgeprägt werden, die zur Hemmung der Wirtsfunktionen und zur T4-DNA-Replikation erforderlich sind, werden in der "späten" Phase vor allem diejenigen Gene transkribiert, welche für die Hüllproteine des Phagen codieren.

Die Strukturproteine des Phagen und die DNA werden nach einem äußerst komplizierten Schema zu dem intakten Phagenpartikel zusammengefügt. Zunächst entstehen Virusköpfe, welche die DNA im Innern enthalten, und Phagenschwänze mit Basalplatte. Diese werden dann miteinander verbunden und mit den Schwanzfibern versehen (34).

Etwa 100 bis 200 Viruspartikel entstehen in einer Bakterienzelle, werden bei der Lyse der Zelle freigesetzt und können dann wieder Zellen infizieren.

2. Alteration der E. coli-RNA-Polymerase

2.1. Einführung

Von Seifert et al. (10) wurde 1969 die Phosphorylierung der RNA-Polymerase bei T4-Phageninfektion in Abwesenheit von Proteinsynthese beschrieben. Diese Veränderung der Polymerase wurde Alteration genannt zur Unterscheidung von der Modifikation, einer zweiten Phosphorylierung, die durch ein in der Zelle synthetisiertes, phagenspezifisches Protein katalysiert wird. Da das Abschalten der Wirtstranscription parallel zum Auftreten der alterierten Polymerase abläuft, und da isolierte alterierte RNA-Polymerase veränderte Transcriptionseigenschaften zeigt, wurde angenommen, daß die Alteration der RNA-Polymerase für die Hemmung der Wirtstranscription verantwortlich ist (10,35).

Über die Struktur der alterierten Polymerase ist bekannt, daß 2 Phosphatreste und ein Adeninrest pro alterierter α -Untereinheit kovalent gebunden sind (29). Neben der α -Untereinheit werden in geringem Ausmaß auch die anderen Untereinheiten der Polymerase "phosphoryliert".

Nur die Hälfte der α -Untereinheiten wird alteriert. Als mögliche Mechanismen der Alteration wurden die Auslösung einer Wirtsfunktion durch Änderungen der Zellmembran oder durch eines der internen T4-Proteine, die bei der Infektion in die Zelle eingebracht werden, diskutiert (18). Es wurde auch vermutet, daß eines dieser internen T4-Proteine die Fähigkeit zur Alteration der RNA-Polymerase besitzt.

Durch die Entdeckung von T4-Mutanten, die nicht mehr alterieren bzw. nicht mehr modifizieren können, leistete Horvitz (17, 18) einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis der Alteration und Modifikation.

Er konnte zeigen, daß Alteration und Modifikation von verschiedenen Genen kontrolliert werden, und unabhängig voneinander auftreten. Alteration und Modifikation gehören zu den vielen bekannten T4-Funktionen, welche die Transcriptions- und Translationsmechanismen der Wirtszelle verändern oder ergänzen, die aber nicht essentiell sind, d.h. ihr Fehlen verhindert nicht die Vermehrung des Phagen in den laborüblichen *E. coli*-Stämmen.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Mechanismus der Alteration und die chemische Struktur der alterierten Polymerase analysiert werden.

2.2. Isolierung des Alterationsenzyms

2.2.1. Vorversuch

Von Horvitz (18) wurde 1974 beschrieben, daß den alterationslosen T4-Mutanten (T4alt⁻) ein bestimmtes Protein fehlt (Abb. 1). Daher lag die Vermutung nahe, daß dieses Protein entweder ein alterierendes Enzym der Wirtszelle aktiviert oder aber die Alterationsreaktion selbst katalysiert.

Wenn es selbst für die Reaktion verantwortlich ist, muß es zusammen mit den internen T4-Proteinen IP I, II und III bei der Injektion der DNA in die Zelle eingebracht werden.

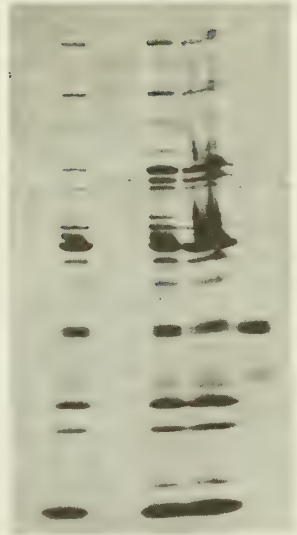
Bekanntlich geben die Bakteriophagen T4, T6 und T2 ihre DNA auch dann ab, wenn sie osmotisch geschockt werden (36): Bringt man die Viren aus konzentrierten Salz-, Glycerin- oder Sucroslösungen sehr schnell auf 10-100-fach niedrigere Konzentrationen so verlieren sie ihre DNA zusammen mit den internen Proteinen.

Man kann also annehmen, daß ein Protein, das mit der DNA bei der Infektion in die Zelle eingeschleust wird, auch bei osmotischem Schock mit der DNA aus dem Phagenkopf austreten wird. Im Schockat, das aus Phagenköpfen, Phagenschwänzen, DNA und den freigesetzten Proteinen besteht, sollte dann Alterationsaktivität nachzuweisen sein.

Nun stellte sich die Frage: Welche chemische Verbindung ist das Substrat des alterierenden Enzyms?

Im Reaktionsprodukt, der α -Untereinheit alterierter Polymerase, wurden 2 Phosphatreste und ein Adenin nachgewiesen. Von Goff (31) wurde gezeigt, daß ein Rohextrakt aus T4-infizierten Zellen einen Adenosindiphosphoriborest (ADP-Ribose) aus Nicotinadenindinucleotid (NAD⁺) auf die α -Untereinheit der RNA-Polymerase überträgt.

Abb. 1: Auftrennung der Proteine
verschiedener T4-Phagen und von
gereinigtem Alterationsenzym durch
SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
(in einem exponentiellen Gradienten
von 5-25% Acrylamid). Von links nach
rechts wurden T4alt⁻, gereinigtes
Alterationsenzym, T4mod⁺, T4mod⁻
und DNase aufgetragen. Die Phagen
wurden gegen TMA dialysiert, 3 Mi-
nuten lang bei 100°C inkubiert, für
15 Minuten mit 3 µg DNase/Probe
verdaut, mit Lämmli-Probenpuffer
gemischt, erneut 3 Minuten bei
100°C inkubiert und dann auf das
Gel aufgetragen.



Es ist nach unserer Meinung unklar, ob dieser Rohextrakt die
RNA-Polymerase modifiziert, wie Goff behauptet. Verschiedene
Ergebnisse, unter anderem der Zeitpunkt des Auftretens der
Aktivität nach Infektion, deuten darauf hin, daß in den Roh-
extrakten alterierendes Enzym enthalten ist (s. Kap. 2.8.).
In diesem Fall wäre NAD⁺ das Substrat des Alterationsenzym.

T4⁺-Phagen, die das alt-Protein enthalten, und, zur Kon-
trolle, T4alt⁻-Phagen, wurden osmotisch geschockt. Das
Schockat wurde in einem Konzentriergerät eingengt und
danach mit radioaktiv markiertem NAD⁺ (im Adenin mar-
kiert) und RNA-Polymerase inkubiert. Die RNA-Polymerase
wurde mit Antikörper gefällt und durch SDS-Polyacryl-
amidgelelektrophorese in die einzelnen Untereinheiten
aufgetrennt. In der angefärbten α -Bande konnte Radioak-
tivität nachgewiesen werden. Intakte Phagen und osmotisch
geschockte alt⁻-Phagen zeigten keine Aktivität.

Das Schockat aus $T4^+$ enthält also eine Aktivität, die aus NAD^+ einen radioaktiven Pest auf die α -Untereinheit der RNA-Polymerase überträgt. In den folgenden Kapiteln wird die Isolierung und Charakterisierung dieses Enzyms beschrieben.

2.2.2. Verlauf der Reinigung des Enzyms

Um die Anreicherung der Aktivität im Verlauf der Isolierung schneller verfolgen zu können, wurde der oben beschriebene umständliche Enzymtest vereinfacht:

Der Einbau von Radioaktivität aus NAD^+ in RNA-Polymerase bzw. in das wesentlich bessere und billigere Substrat Lysozym, wurde durch Fällung des radioaktiv markierten Substratproteins mit Trichloressigsäure (TCA) verfolgt. Die Abtrennung der Proteine von nicht-eingebautem und daher säurelöslichem NAD erfolgte mit einer Filtermethode (s. Material und Methoden).

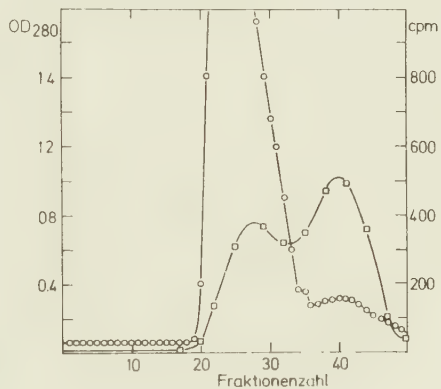
Zunächst wurde untersucht, welche der in der Literatur beschriebenen Methoden, den Phagen zu entleeren, die höchste Ausbeute an Alterationsaktivität ergibt. Es stellte sich heraus, daß osmotischer Schock von T4-Phagen, die mit 50%igem Glycerin äquilibriert worden waren, allen anderen Methoden, den Phagen zu Öffnen (37) überlegen ist.

Für die Isolierung des Enzyms wurden mehrere 100 mg, über $CsCl$ -Gradienten gereinigte T4-Phagen aus 50% Glycerin osmotisch geschockt. Nachdem die ausgetretene T4-DNA mit DNase verdaut worden war, wurde das Schockat mittels Druckdialyse und Ammoniumsulfatfällung (60%) konzentriert.

Durch Gelfiltration auf einer Biogelsäule konnte danach das freigesetzte Enzym von leeren Phagenköpfen und anderen großen Phagenstrukturen abgetrennt werden. Ein von Präparation zu Präparation wechselnder Prozentsatz der Enzymaktivität blieb an die Phagenstrukturen gebunden und erschien im Ausschlusßvolumen, freies Enzym wurde im Fraktionsbereich der Säule nachgewiesen (Abb. 2).

Abb. 2: Gelchromatographische Abtrennung freigesetzter Alterations-transferase von Phagenghosts

Das konzentrierte Phagenschockat (800 mg Protein) wurde auf einer Biogel-Säule (A-1, 5 m; 3x90 cm) aufgetrennt. (Elutionspuffer: TAG + 1,2 M NaCl) Die Transferaseaktivität wurde mit dem Standardtest verfolgt (s. Material und Methoden).



Durch Inkubation des Schockats mit 0.01% Brij 58, einem nicht-ionischen Detergens, kann alle strukturell gebundene Aktivität freigesetzt werden. Da dann jedoch Schwierigkeiten bei der Fällung des Enzyms durch Ammoniumsulfat entstehen, welche die weitere Anreicherung erschweren, wurde auf eine Brij-Behandlung im Reinigungsgang verzichtet.

Die Fraktionen, welche freies Enzym enthielten, wurden vereinigt und durch Chromatographie auf DEAE-Cellulose-Säulen weiter aufgetrennt. Dabei erscheint die Alterationsaktivität im Durchlauf.

Bereits nach diesen wenigen Schritten ist das Protein völlig rein. In der Analyse durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ist nur eine Proteinbande zu erkennen (Abb. 1), die identisch ist mit der Proteinbande, die in T4alt⁻-Phagen abwesend ist.

Die spezifische Aktivität des gereinigten Enzyms beträgt unter Standardbedingungen 14 mU/mg.

Da einige Phagenproteine bessere Substratproteine als das im Test eingesetzte Lysozym sind, war es nicht möglich, die Enzymanreicherung durch Bestimmung der spezifischen Aktivität zu verfolgen. Die Abtrennung von Phagenproteinen, die zur Erhöhung der spezifischen Aktivität des Enzyms führen sollte, verringerte die meßbare spezifische Aktivität, da Substratproteine entfernt wurden.

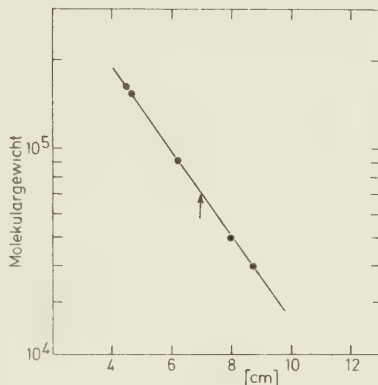
2.3. Physikalische Eigenschaften des Alterationsenzym

Das Molekulargewicht des Alterationsenzym wurde aus seiner Wanderungsstrecke in einer SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese bestimmt. Da die von einem Protein zurückgelegte Strecke proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts ist (38), kann man mit Proteinen bekannten Molekulargewichts eine Eichgerade aufstellen. Diese lineare Abhängigkeit besteht nicht nur in homogenen Gelen, sondern auch in Gelen die einen exponentiellen Acrylamidgradienten enthalten (39).

Aus der Eichgerade, die mit den Untereinheiten der RNA-Polymerase und dem Terminationsfaktor ρ erstellt worden war, wurde für das Alterationsenzym ein Molekulargewicht von 70 000 bestimmt (Abb. 3).

Abb. 3: Molekulargewichtsbestimmung des gereinigten Alterationsenzyms durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die von α , β , β' , σ , von gereinigtem Alterationsenzym und von Terminationsfaktor ρ in einem exponentiellen SDS-Polyacrylamidgradientengel (5-25%) zurückgelegten Strecken wurden logarithmisch gegen das bekannte Molekulargewicht der Proteine aufgetragen.



Horvitz (18) hat für das in T4alt⁻-Phagen fehlende Protein ein Molekulargewicht von 61 000 angegeben. Da die Molekulargewichtsbestimmungen in verschiedenprozentigen SDS-Polyacrylamidgelen zu leicht verschiedenen Ergebnissen führen können (40,41), sind alle diese Werte solange als Näherungswerte zu betrachten, bis sie durch andere Methoden abgesichert sind.

Neben dem Molekulargewicht des Proteins interessierte die Frage, ob das alt-Protein als Monomer oder als Di- bzw. Oligomer vorliegt.

In Sucrosegradienten sedimentiert das Enzym als ein homogener Aktivitätsgipfel mit derselben Geschwindigkeit wie t-RNA aus E. coli und zwar sowohl bei niedriger (TMA) als auch bei hoher Ionenstärke (TMA + 1 M NaCl).

Rinderserumalbumin ist ein globuläres Protein mit einem Molekulargewicht von 65 000 und besitzt wie t-RNA eine Sedimentationskonstante von 4S.

Unter der Voraussetzung, daß das Alterationsenzym eine globuläre Struktur besitzt, kann man also den Schluß ziehen, daß es sowohl unter den Bedingungen des Reaktionsansatzes als auch bei hoher Ionenstärke als Monomer vorliegt.

Außerdem kann man diesem Ergebnis entnehmen, daß nicht eine Verunreinigung (mit kleinerem oder größerem Molekulargewicht), sondern in der Tat das Protein mit dem Molekulargewicht 70 000 das aktive Alterationsenzym ist.

Das Enzym wird leicht inaktiviert. Bei 37°C sinkt die Aktivität innerhalb von 15 Minuten auf 60% des Ausgangswertes ab. Dagegen ist bei 15°C nach 6 Stunden noch keine Aktivitätsabnahme festzustellen. In flüssigem Stickstoff aufbewahrt, ist das Enzym über mehrere Monate stabil. Große Aktivitätsverluste treten bei wiederholtem langsamen Einfrieren und Auftauen auf.

Das Enzym wird nicht an DEAE-Cellulose adsorbiert, und wandert im elektrischen Feld bei pH 7,5 zur Kathode, was auf einen Isoelektrischen Punkt oberhalb pH 7,5 schließen läßt.

Das Alterationsenzym bindet jedoch auch nicht an Phosphocellulose und T4-DNA-Cellulose (42). Die Frage, ob das Alterationsenzym an DNA binden kann, wurde zusätzlich im Bindungstest nach Hinkle und Chamberlin (43) untersucht. Selbst bei einem Verhältnis von 30 Enzymmolekülen pro T7-DNA wurde keine DNA auf dem Filter zurückgehalten. Diese Filtermethode beruht darauf, daß radioaktiv markierte DNA über die untersuchten Proteine an Nitrocellulosefilter gebunden wird. Ein RNA-Polymerase-Molekül reicht z.B. aus, um ein T7-DNA-Molekül an Nitrocellulosefilter zu binden.

Das Alterationsprotein wird also bei der Infektion nicht wie die internen T4-Proteine als Komplex mit der DNA in die Wirtszelle eingeschleust. Es ist jedoch möglich, daß es über die internen Proteine mit der DNA verbunden ist.

2.4. Reaktionsbedingungen

Die Reaktionsansätze enthielten in gepufferter Lösung das Alterationsenzym, NAD^+ (0,25 mM, 50 Ci/M), das im Adeninrest mit Tritium markiert ist, und ein Substratprotein (Tab. 1).

Tabelle 1: Reaktionsbedingungen

Reaktionsbedingungen	TCA-fällbare Radioaktivität (cpm)
Vollständiger Ansatz (Lysozym)	5481
ohne Alterationsenzym	128
0°C 0 Min Inkubation	124
Enzym 3 Min bei 100°C inkubiert	148
ohne Mg^{++}	6514
ohne Akzeptorprotein	233
BSA (15 µg) als Akzeptor	577
RNA-Polymerase (40 µg) als Akzeptor	474
T4mod. RNA-Polymerase (40 µg) als Akzeptor	673
Minimalenzym (40 µg) als Akzeptor	782

Standardansätze (50 Ci/M NAD^+ , 1,4 µg Transferase/Test) wurden für 30 Minuten bei 15°C inkubiert. Die jeweiligen Änderungen sind in der Tabelle angegeben. Für die Inkubation ohne Magnesiumacetat wurde die Transferase gegen TA-Puffer dialysiert und in den Ansatz wurde 5 mM EDTA gegeben.

Das Ausmaß der Reaktion ist proportional zur eingesetzten Enzymmenge.

Zugesetztes unmarkiertes NAD^+ verringert die spezifische Aktivität des radioaktiv markierten Substrats und setzt dadurch den Einbau in das Empfängerprotein herab. Unmarkiertes NAD^+ , das

nach der Inkubation zugegeben wird, kann den radioaktiv markierten Rest aus dem Substratprotein nicht mehr verdrängen: Dieser Versuch schließt aus, daß NAD^+ bei der Reaktion nur an das Akzeptorprotein adsorbiert wird.

Magnesiumionen sind nicht erforderlich für die Reaktion. Sie hemmen die Umsetzung sogar in geringem Ausmaß (Tab. 1).

Als Akzeptorproteine für die Übertragung des radioaktiven Restes können neben normalem Vollenzym und Minimalenzym (RNA-Polymerase ohne σ -Faktor) auch modifizierte RNA-Polymerase und selbst heterologe Proteine dienen (Tab. 1). Die in vitro-Alteration der RNA-Polymerase wird in Kap. 2.5. ausführlich diskutiert.

Da Lysozym ein sehr viel wirksamerer Akzeptor ist als RNA-Polymerase, wurde es für alle Routineversuche verwendet.

Das Temperaturoptimum der Reaktion liegt zwischen 15°C und 20°C (Abb. 4). Bei 15°C verläuft die Kinetik linear über mindestens 6 Stunden. Bei dieser Temperatur wird in einem Zeitraum von 15 Minuten etwa 5 mal mehr Substrat umgesetzt als bei 37°C (Abb. 4). Aus diesem Grunde wurden alle Inkubationen bei 15°C durchgeführt.

Bei 37°C sinkt die anfänglich hohe Einbaugeschwindigkeit innerhalb von etwa 10 Minuten auf einen konstanten Wert ab, der 4-8mal kleiner ist, als der Wert bei 15°C . Bringt man den Ansatz auf 15°C zurück, so bleibt die Syntheserate niedrig (Abb. 5).

Das Enzym alteriert sich selbst und zwar sowohl bei 15°C als auch bei 37°C .

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der NAD^+ -Konzentration ergibt einen nicht-linearen Lineweaver-Burk-plot. Aus dem linearen Teil der Kurve wurde eine scheinbare Michaelis-Konstante für NAD^+ , $K_{m_{\text{app}}}$ von 0,05 mM berechnet (Abb. 6).

Abb. 4: Temperaturabhängig-
keit der Alterationsreaktion

Die Reaktionsansätze wurden für 15 Minuten bei den angegebenen Temperaturen unter Standardbedingungen ($^3\text{H-NAD}^+$ 50 Ci/M) inkubiert.

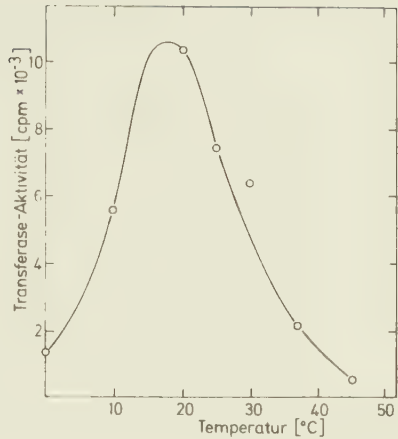
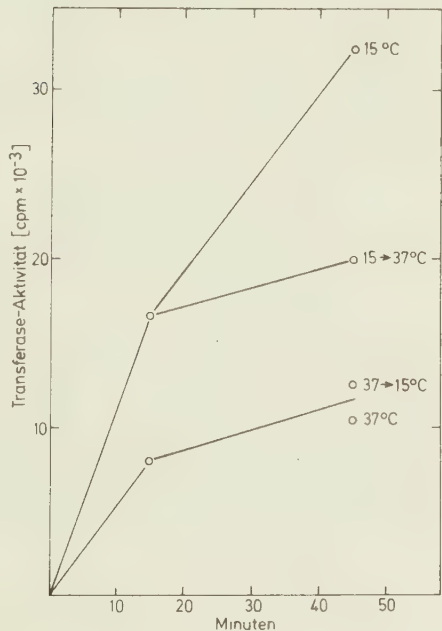


Abb. 5: Einfluß der Temperatur
auf die Kinetik der
Alterationsreaktion

100 μl Standardreaktionsansätze wurden für verschiedene Zeiten bei 15°C oder 37°C inkubiert. Zwei Ansätze wurden zunächst 15 Minuten lang bei der einen Temperatur inkubiert, dann auf die andere Temperatur gebracht und für weitere 30 Minuten inkubiert.



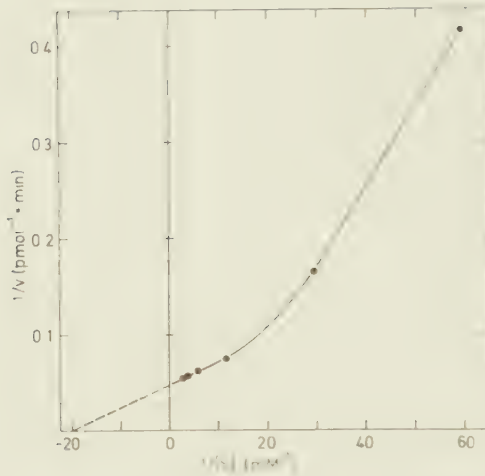


Abb. 6: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Alteration von der Substratkonzentration, aufgetragen nach Lineweaver-Burk

In den üblichen Standardansätzen (50 Ci/M) wurde die NAD^+ -Konzentration wie angegeben variiert.

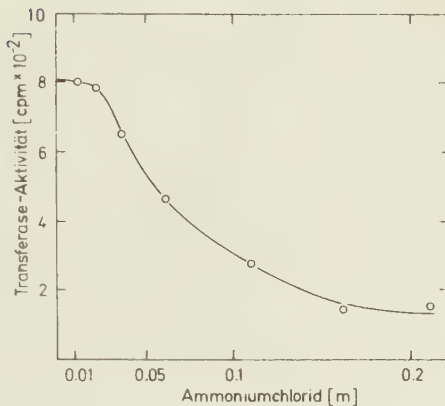
Als weitere Reaktionsparameter wurden die Ionenstärke und der pH variiert. Die Aktivität des Enzyms nimmt stark ab, wenn die Salzkonzentration über den Wert 0,02 M ansteigt (Abb. 7).

Die Wasserstoffionenkonzentration beeinflusst das Ausmaß der Reaktion in dem Bereich zwischen pH 6 und 8,5 nur gering, das Optimum liegt bei pH 7,5.

Die Übertragung eines radioaktiv markierten Restes aus $^3\text{H-NAD}^+$ auf verschiedene Substratproteine ist eine enzymatische Reaktion und wird durch das Alterationsenzym katalysiert.

Abb. 7: Salzabhängigkeit
der Aktivität gereinig-
ter Transferase

Ein Reaktionsansatz mit 50 μ l Gesamtvolumen enthielt 7,5 μ g Lysozym 1 μ g gereinigte Transferase, 0,25 mM ^3H -NAD 25 Ci/M und die angegebenen Mengen NH_4Cl in TMAG-Puffer. Die Ansätze wurden für 15 Minuten bei 15°C inkubiert.



Da der radioaktiv markierte Rest auch nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese in den Akzeptorproteinen nachgewiesen werden konnte, und durch NAD^+ nicht verdrängt wird, kann man annehmen, daß der Rest kovalent mit den Proteinen verknüpft ist.

Man kann sich vorstellen, daß der Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit bei 37°C (Abb. 5) eine Umwandlung des Enzyms von einer aktiven in eine schwach aktive Form widerspiegelt.

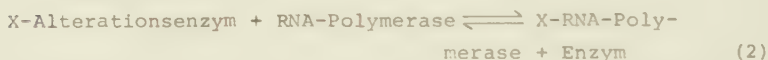
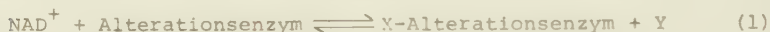
Da die Inaktivierung zu einer definierten Restaktivität führt, wird der Rückgang vermutlich durch eine gleichmäßige Umwandlung aller Enzymmoleküle und nicht durch eine Totalinaktivierung eines bestimmten Teils des Enzyms verursacht. Die Inaktivierung ist kein reversibler Vorgang, wie z.B. die allosterische Umwandlung vieler Enzyme, denn bei Erniedrigung der Temperatur von 37°C auf 15°C wird die aktivere Enzymform nicht zurückgebildet (Abb. 5).

Da die starke Inaktivierung nur in Gegenwart von Substrat auftritt, nehmen wir an, daß die Selbstalteration des Enzyms für den Umschaltprozeß von Bedeutung ist. Es ist denkbar, daß die Selbstalteration bei höherer Temperatur mit anderer Spezi-

fität abläuft als bei 15°C und auf diese Weise zur Inaktivierung führt, oder daß nur die alterierte Enzyform die erhöhte Temperaturempfindlichkeit besitzt.

In vivo könnten zusätzliche Proteine und Faktoren einen Schutz vor Inaktivierung gewährleisten. Andererseits könnte die Temperaturempfindlichkeit des Enzyms die rasche Abnahme der Alterationsaktivität nach Infektion erklären (Abb. 22).

Das "alterierte Alterationsenzym" könnte eine obligate Zwischenverbindung der Alterationsreaktion sein, die dann nach folgendem Schema ablaufen würde: ($\text{NAD}^+ = \text{X-Y}$)



Beispiele für diesen Reaktionsmechanismus sind bekannt:

Ligase aus *E. coli* katalysiert die Verknüpfung zweier DNA-Stücke, wobei NAD^+ in NMN und AMP gespalten wird. Im ersten Reaktionsschritt wird der AMP-Rest auf einen Lysinrest in der Ligase übertragen (44).

Auf Grund der vorliegenden Daten kann ein derartiger Reaktionsmechanismus für die Alteration nicht bewiesen, jedoch auch nicht ausgeschlossen werden.

Viele enzymatische Reaktionen laufen nach einem Mechanismus ab, für den die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration durch die Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben wird:

$$v = \frac{v_m}{\left(\frac{K_m}{S} + 1\right)}$$

- v = Reaktionsgeschwindigkeit
- v_m = Maximale Reaktionsgeschw.
- K_m = Dissoziationskonstante des Enzym-Substratkomplexes (Michaelis-Konstante)
- S = Substratkonzentration

Trägt man nach Lineweaver-Burk $1/v$ gegen $1/S$ für steigende Substratkonzentrationen auf, erhält man eine Gerade, aus der man V_m und K_m bestimmen kann. Wie nun aus Abb. 6 zu ersehen ist, wurde für die Alterationsreaktion bei 15°C keine Gerade erhalten.

Ein nicht-linearer Kurvenverlauf in der Auftragung nach Lineweaver-Burk sagt aus, daß die Annahmen über den Reaktionsmechanismus, die in der Michaelis-Menten-Gleichung enthalten sind, für die untersuchte Reaktion nicht zutreffen. Die Angabe der K_m ist nicht sinnvoll, da deren Bedeutung nun unklar ist, und sicher nicht mehr der Dissoziationskonstanten des Enzym-Substratkomplexes entspricht. Trotzdem wird üblicherweise eine scheinbare $K_{m,app}$ angegeben, die in diesem Fall für NAD^+ $0,05 \text{ mM}$ beträgt.

Man kann aus den vorliegenden Daten nicht entscheiden, welcher von den verschiedenen Mechanismen (45), die zu sigmoider Abhängigkeit zwischen Geschwindigkeit und Substratkonzentration führen, bei der Alteration vorliegt. Die Möglichkeit der Allosterie ist allerdings auszuschließen, da das Enzym als Monomer aktiv ist. Der einfachste Mechanismus, der die Daten erklären würde, wäre, daß 2 Substratmoleküle an das Enzym binden können, und daß dieser Komplex das Substrat schneller umsetzt als der Komplex mit nur einem Substratmolekül. Dieser Mechanismus ist bei der NADH-Oxydase verwirklicht (46).

2.5. In vitro - Alteration von RNA-Polymerase und anderen Proteinen

Am Ausgangspunkt der Untersuchungen stand die Entdeckung, daß osmotisch geschockte T4-Phagen einen Teil des Moleküls NAD^+ auf die α -Untereinheit der RNA-Polymerase übertragen können. Nachdem das Enzym aus den Phagen isoliert worden war und die optimalen Reaktionsbe-

dingungen bestimmt worden waren, folgte die Charakterisierung dieser Alterationsreaktion. Die Spezifität der Reaktion und die chemische Struktur des bei der Alteration übertragenen Restes konnten nun analysiert werden.

Da das Ergebnis der Strukturanalyse Voraussetzung ist für das Verständnis dieses Abschnitts, soll das Resultat unserer Analyse vorweggenommen werden: Bei der Alteration wird ein ADP-Riboserest aus dem NAD^+ auf die Empfängerproteine übertragen.

2.5.1. In vitro-Alteration von normaler PNA-Polymerase

Nach Infektion der Bakterienzelle mit T4 in Gegenwart von Chloramphenicol sind neben ADP-ribosyliertem α auch ADP-ribosyliertes σ , β und β' zu beobachten (29,18). Wir untersuchten zunächst, ob in vitro, bei der Alteration der RNA-Polymerase durch das isolierte alt-Protein, dasselbe ADP-Ribosylierungsmuster auftritt wie in vivo. Die Untereinheiten der RNA-Polymerase wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese oder durch Cellogelelektrophorese (Abb. 8) voneinander getrennt.

Wird die RNA-Polymerase mit radioaktiv markiertem NAD^+ in vitro alteriert, und nach der Reaktion durch Elektrophorese in SDS-Polyacrylamidgelen in die einzelnen Untereinheiten getrennt, so kann man in allen Untereinheiten Radioaktivität nachweisen.

Im unteren Teil der Abb. 8 sieht man die angefärbten Untereinheiten verschiedener PNA-Polymerasen nach Auftrennung in einer Cellogelelektrophorese. In Bahn A wurde modifizierte RNA-Polymerase aufgetragen. Diese Präparation enthält ca. 20% nicht-modifiziertes α . In Bahn C wurden die Untereinheiten eines Vollenzyms aus uninfizierten Zellen getrennt. Bahn B zeigt die Wanderung der Untereinheiten dieses Voll-

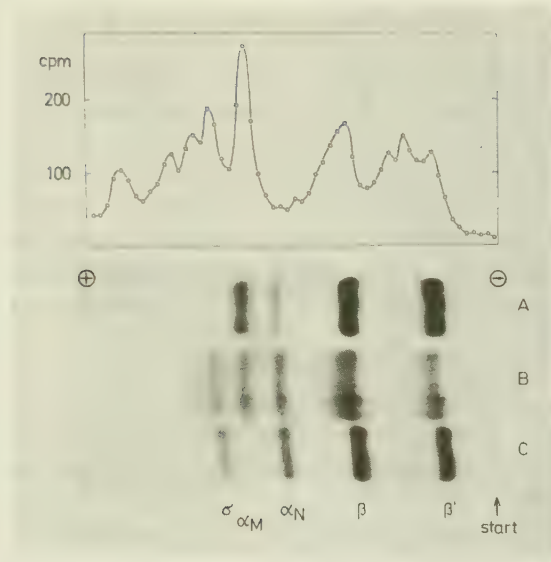


Abb. 8: Auftrennung in vitro alterierter RNA-Polymerase durch
Elektrophorese auf Celluloseacetatstreifen

48 μg normaler RNA-Polymerase (Bahn C) wurden unter Standardbedingungen für 24 Stunden ($^3\text{H-NAD}^+$ 100 Ci/M. 2,1 μg Alterationsenzym) in vitro alteriert und auf Cellogelelektrophorese (Bahn B) aufgetrennt. Bahn B wurde in Streifen geschnitten und die Radioaktivität in den Streifen wurde bestimmt. Das Ergebnis dieser Analyse ist im oberen Teil der Abbildung aufgetragen. A = T4-modifizierte RNA-Polymerase. Diese Präparation enthält ca. 20% normales α .

enzym, nachdem es in vitro alteriert worden war. B wurde nach dem Anfärben in Streifen geschnitten. Die Radioaktivität in den Streifen wurde ermittelt. Das Ergebnis dieser Analyse ist im oberen Teil der Abbildung aufgetragen. Alle anfärbbaren markierten Banden in der Cellogelelektrophorese wurden zur Identifizierung in SDS-Polyacrylamidgelen analysiert. Sie zeigten gleiches Wanderungsverhalten wie die unmarkierten Untereinheiten.

Neben der Trennung nach Molekulargewicht in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese kann man die Untereinheiten der PNA-Polymerase auch nach ihrer Ladungsdichte durch Elektrophorese auf Celluloseacetatstreifen in 6 M Harnstoff auftrennen. Für die Aufspaltung von modifizierter und normaler α -Untereinheit hat sich die Verwendung von Boratpuffern (mit Harnstoff) bei pH 9,2 bewährt. Die Borsäure bildet mit den eis-ständigen OH-Gruppen im ADP-Riboserest geladene Komplexe und erhöht somit die Ladungsdichte der modifizierten α -Untereinheit.

Bei der Alteration der PNA-Polymerase in vitro entsteht ein Protein, das dieselbe Beweglichkeit im elektrischen Feld besitzt (Abb. 8) wie das modifizierte α_m und das in SDS-Polyacrylamidgel als α identifiziert wurde: Es ist alteriertes α , α_a . Dieses alterierte α enthält den Hauptteil der auf die α -Untereinheit übertragenen Radioaktivität. Eine zweite, weitaus schwächere Bande, die ebenfalls als α identifiziert wurde, wandert etwas schneller als σ zur Anode. Die gesteigerte Beweglichkeit läßt auf die Einführung von 2 ADP-Riboseresten in dieses α schließen, das nur ca. 5% der Gesamtmenge der α -Untereinheiten darstellt.

Zwei unidentifizierte markierte Proteine wandern sogar noch schneller als das doppelt alterierte α . Sie sind in so geringer Menge vertreten, daß sie durch Anfärben nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Wahrscheinlich sind diese Produkte σ - und α -Untereinheiten, die mehrfach ADP-ribosyliert sind.

Aus der identischen Beweglichkeit von α_m und α_a kann man folgern, daß bei Alteration und Modifikation die gleiche Anzahl von Riboseresten in die α -Untereinheit eingeführt werden. Wahrscheinlich ist die Ladungsdichte der σ -Untereinheit so groß, daß sie durch die zugefügten Ladungen des ADP-Riboserestes nur wenig ansteigt.

Die alterierten β - und β' -Untereinheiten bewegen sich schneller zur Anode als die normalen Untereinheiten. Man beobachtet bei β' drei Aktivitätsgipfel, während markiertes β

eine breite Bande bildet. Diese Aufspaltung bzw. Verbreiterung kann durch das Entstehen mehrerer Reaktionsprodukte, die sich in ihrem Gehalt an ADP-Riboseresten unterscheiden, erklärt werden.

Verfolgt man die Kinetik der in vitro-Alteration von RNA-Polymerase durch Analyse der Produkte mittels Cellogelelektrophorese und Radioaktivitätsbestimmung, so stellt man fest, daß σ , α und β' schneller alteriert werden als β . Die Alteration der α -Untereinheit erreicht nach etwa 6 Stunden, wenn ca. 50% als α_a vorliegen, ein Plateau.

In die anderen Untereinheiten werden mit zunehmender Inkubationsdauer immer mehr ADP-Ribosereste eingebaut.

Erneute Zugabe von Alterationsenzym und Substrat nach einer Inkubationsdauer von 20 Stunden führt nicht zur Alteration der nicht umgesetzten, zweiten Hälfte der α -Untereinheiten. Nach einer 25-stündigen Inkubation wurden 1,7 ADP-Ribosereste pro β' , 1,3 pro β und 0,7 pro σ -Untereinheit bestimmt.

Setzt man Minimalenzym in die Reaktion ein, wird ebenfalls nur die Hälfte der α -Untereinheiten ADP-ribosyliert.

Alteriert man die freie α -Untereinheit, so wird alles α ADP-ribosyliert und man erhält neben etwas α_a vor allem mehrfach alterierte Produkte.

Nur die Hälfte der α -Untereinheiten der RNA-Polymerase wird ADP-ribosyliert, ca. 5% der Untereinheiten werden mit einem zweiten Rest beladen.

Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen, daß in vivo nie mehr als 50% der α -Untereinheiten alteriert werden (29).

Die spezifische Markierung von nur 50% der Untereinheiten wird nicht dadurch verursacht, daß die σ -Untereinheit eine der α -Untereinheiten vor dem Angriff der Reaktion schützt, denn Minimalenzym zeigt dasselbe Verhalten.

Nun kann man natürlich die Frage stellen, wird nur jeweils eine α -Untereinheit eines Polymerasemoleküls ADP-ribosyliert, oder gibt es zwei Populationen von Enzymen, deren α -Untereinheiten entweder gar nicht, oder vollständig, reagieren?

In in vivo-alterierte Polymerase konnte von Rabussay (47) durch Phosphocellulosechromatographie in 2 Enzymklassen aufgespalten werden, in normales Minimalenzym und in ein altes Minimalenzym, dessen α -Untereinheiten genau zur Hälfte alteriert waren.

Da isoliertes α in vitro vollständig zu α_a (bzw. α_{2a} , α_{3a} s.o.) umgesetzt wurde, ist die 50%ige ADP-Ribosylierung der α -Untereinheiten in Voll- und Minimalenzym wohl so zu verstehen, daß 2 identische α -Untereinheiten in der dreidimensionalen Struktur der PNA-Polymerase asymmetrisch angeordnet sind, so daß nur eine der beiden eine akzeptierende Gruppe exponiert, die dann ADP-ribosyliert werden kann.

Die Beobachtung, daß die α -Bande in der SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese häufig in zwei Banden aufgespalten wird, führte zu der Hypothese, daß die PNA-Polymerase zwei verschiedene Untereinheiten α und α' enthält. Durch die Annahme, daß nur α bzw. nur α' ADP-ribosyliert wird, könnte die asymmetrische Alteration gut erklärt werden. Dann wäre zu erwarten gewesen, daß nach Auftrennung von in vitro-alterierter Polymerase nur in einer der beiden α -Banden Radioaktivität nachgewiesen werden kann.

Diese Vermutung konnte jedoch nicht bestätigt werden, die Radioaktivität in den beiden α -Banden einer mit ^3H -NAD⁺ und alt-Protein umgesetzten Polymerase ist genau gleich groß.

Die asymmetrische Alteration der α -Untereinheiten wird also nicht dadurch bewirkt, daß die Polymerase zwei verschiedene α -Untereinheiten α und α' besitzt.

Von Fujiki et al. (48) wurde gezeigt, daß eine Mutation in einem α -Gen zu einem veränderten Phänotyp aller in der Zelle vorhandenen α -Untereinheiten führt. Dieses Experiment spricht eindeutig gegen die Annahme eines zweiten Gens für die Untereinheit α .

2.5.2. In vitro-Alteration von modifizierter RNA-Polymerase

Wird modifizierte RNA-Polymerase in vitro alteriert, erhält man zwar sehr viel alteriertes β und β' , modifiziertes α wird jedoch nicht umgesetzt. In ganz geringem Maße entsteht ein Produkt, das sich in der Cellogelelektrophorese wie doppelt alteriertes α verhält (Abb. 9). Da das modifizierte Enzym etwas normales α enthielt, wurde bei der Reaktion außerdem etwas markiertes α_m bzw. α_a gebildet.

Der Rest, der durch modifizierendes Enzym in die α -Untereinheit eingeführt worden war, blockiert den ADP-Ribosylierungsvorgang der Alteration. Entweder reagieren beide Enzyme mit derselben Aminosäure in α oder sie beladen zwei so dicht beieinanderliegende "Akzeptoren", daß durch sterische Hinderung eine doppelte Besetzung nicht möglich ist.

Trifft die erste Möglichkeit zu, so bedeutet das, daß modifiziertes und alteriertes α identisch sind, zumindest in Hinsicht auf die beladene Aminosäure.

Die zu diesem Problem vorliegenden in vivo-Untersuchungen widersprechen einander: Seifert et al. (29) analysierte die Polymerase aus ^{32}P -markierten, T4-infizierten Zellen und kam zu dem Ergebnis, daß der radioaktive Rest in der alterierten α -Untereinheit an ein anderes tryptisches Peptid gebunden ist als in modifi-

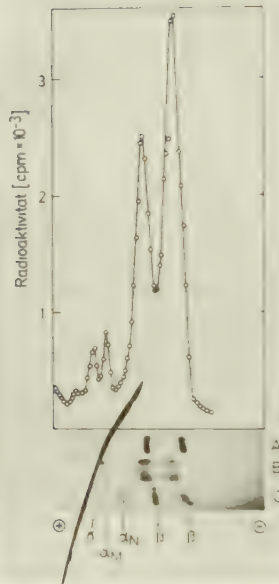


Abb. 9: In vitro-Alteration von modifizierter RNA-Polymerase
und Auftrennung der Produkte durch Elektrophorese auf Cellu-
loseacetatstreifen

^{45}S -modifizierter RNA-Polymerase (Bahn C) wurden unter Standardbedingungen für 24 Stunden ($^{35}\text{S}\text{-NAC}^+$ 107 Ci/M , $3\text{ }\mu\text{g}$ Alterationsenzym) in vitro alteriert und auf Celloacetatstreifen getrennt (Bahn B). Diese Bahn wurde wie in Abb. 8 analysiert. Das Ergebnis ist im oberen Teil der Abbildung aufgetragen. A = normale RNA-Polymerase.

ziertem α . Zillig et al. (32) konnte zeigen, daß der radioaktive Rest in den beiden Polymerasen an dasselbe Peptid der α -Untereinheit gebunden ist. Goff (31) berichtete, daß zwar sowohl in der Alteration als auch in der Modifikation Arginin als Akzeptor dient, daß jedoch die beiden Enzyme nicht dieselbe Aminosäure beladen.

Durch die Isolierung des alterierenden und des modifizierenden Enzyms (R. Skorko pers. Mitteilung) ist es nun möglich, sehr stark radioaktiv markiertes α_a und α_m in vitro herzustellen. Die Sequenzanalyse des modifizierten bzw. alterierten tryptischen Peptids sollte eine endgültige Beantwortung der Frage nach der Identität von α_m und α_a erlauben.

An dieser Stelle soll auf die Arbeit von Horvitz (17) eingegangen werden, da sie Argumente gegen die Identität von α_m und α_a enthält und vor allem da Horvitz ein "alteriertes α " beschreibt, das völlig andere Eigenschaften besitzt als das früher analysierte α_a (19,29).

Horvitz isolierte die Polymerase aus Lysozymlysaten von ^{32}P -markierten, T4-infizierten E. coli-Zellen durch Fällung mit Antikörper gegen gereinigte Polymerase. Anschließend analysierte er die gewonnenen Präzipitate auf SDS-Polyacrylamidgelen. Bei der alterierten Polymerase beobachtete er neben etwas modifiziertem α und den alterierten Untereinheiten β , β' und σ ein "alteriertes α ", das schneller als α_m bzw. α_n zur Anode wandert. Dieses " α_a " konnte nur durch seine Radioaktivität nachgewiesen werden. In dieser Position ist so wenig Protein, daß es nicht angefärbt werden konnte. Horvitz schloß daraus, daß "alteriertes α " mehrfach phosphoryliert ist.

Diese Ergebnisse können jedoch auch folgendermaßen interpretiert werden: Das bei der Alteration entstehende, von Horvitz als α_m bezeichnete α ist die eigentliche alterierte α -Untereinheit. Das " α_a " stellt entweder mehrfach ADP-ribosyliertes α dar, das durch Alteration freier Untereinheiten entstanden sein könnte, oder ein nicht zur Polymerase gehörendes Protein.

Durch diese Interpretation sind die Resultate von Horvitz mit den Ergebnissen in Einklang zu bringen, daß α_a wie α_m nicht mehr als 2 Phosphate enthält (29), und daß α_a in der Cellogelelektrophorese dieselbe Beweglichkeit besitzt wie α_m (Abb. 8), also eine identische Anzahl von Ladungen trägt.

2.5.3. In vitro-Alteration anderer Proteine

Wie schon früher erwähnt (Tab. 1) ist Lysozym ein weitaus besseres Substrat für das Alterationsenzym als RNA-Polymerase oder BSA. Neben der geringen Größe ist der hohe Gehalt basischer Aminosäuren, besonders an Arginin, charakteristisch für Lysozym. Goff (31) beschrieb, daß der ADP-Riboserest in modifiziertem α kovalent mit einem Arginin verknüpft ist, während nach Zillig et al. (32) ein Lysin als Akzeptor in α_m dient. Man kann also vermuten, daß die Beladbarkeit von Proteinen in der Alterationsreaktion mit der Anzahl der Arginin- bzw. Lysinreste ansteigt.

Histone und Protamine sind basische Proteine, Salmin A1 ist ein Protamin, das bei einer Gesamtgröße von 32 Aminosäuren 21 Arginine, jedoch kein Lysin enthält, während Histon F1 3 Arginine und 35 Lysine besitzt.

Salmin A1 und Histon F1 wurden in vitro ADP-ribosyliert. Die radioaktiv markierten Produkte der Reaktion analysierten wir durch Cellogelelektrophorese. Man erkennt in Abb. 10, daß im Falle des Histons ein definiertes Produkt entstanden ist, das etwas langsamer zur Kathode wandert als unbehandeltes Histon F1. Salmin A1 wurde zu einer Gruppe von Produkten umgesetzt, die sehr stark verringerte Wanderungsgeschwindigkeiten aufwiesen. Alteriert man gleiche Mengen Histon F1 und Salmin A1, so werden in Salmin A1, das Arginin-reiche Peptid, 5 mal mehr ADP-Ribosereste pro Peptidmolekül eingeführt als in das Lysin-reiche Histon F1 (Abb. 10).

Wie zu erwarten, wird Poly-L-Arginin sehr stark ADP-ribosyliert, während Poly-L-Lysin als Akzeptorprotein nahezu inaktiv ist (Tab. 2).

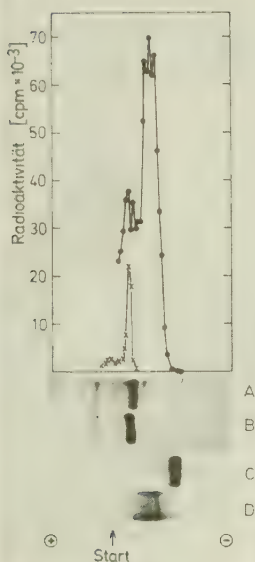


Abb. 10: Alteration von Histon F1 und Salmin A1 und Auftrennung der Produkte durch Cellogelelektrophorese

50 μg Histon F1 (Bahn A) bzw. 50 μg Salmin A1 (Bahn C) wurden unter den üblichen Bedingungen (100 Ci/M NAD^+ , 2,1 μg Transferase) für 1 Stunde bei 15°C inkubiert. Alteriertes Histon F1 (Bahn B) bzw. Salmin A1 (Bahn D) wurden in einer Cellogelelektrophorese aufgetrennt. Die Bahnen B und D wurden wie in Abb. 8 analysiert.

x-x-x Markierung in Histon F1 ●-●-● Markierung in Salmin A1

Untersucht man die Alteration von Lysozym in Gegenwart eines großen Überschusses von freiem Arginin, so beobachtet man, daß durch die Anwesenheit der freien Aminosäure Arginin die ADP-Ribosylierung der Argininreste im Lysozym nicht gehemmt wird.

Tabelle 2: Alterationsreaktion mit Poly-L-Arginin und Poly-L-Lysin als Substratproteine

Substratproteine	fällbare Radioaktivität (cpm)
Poly-L-Arginin	7955
Poly-L-Lysin	314

50 µg Poly-L-Arginin und Poly-L-Lysin wurden mit 1 µg Alterationsenzym unter Standardbedingungen umgesetzt, NAD^+ 50 Ci/M_l und mit t-RNA gefällt (s. Material und Methoden). Die eingebaute Radioaktivität wurde bestimmt. Kontrollwerte, die bei der Inkubation in Abwesenheit von Transferase erhalten wurden (ca. 800 cpm in beiden Fällen), wurden abgezogen.

Um in vitro ADP-ribosyliert werden zu können, muß das Arginin Teil eines Peptids sein, die freie Aminosäure wird von dem Enzym nicht als Substrat akzeptiert.

Die Ergebnisse dieses Kapitels kann man wie folgt zusammenfassen: Die RNA-Polymerase wird in vitro in allen 4 Untereinheiten durch das aus der Phage T4 isolierte Alterationsenzym ADP-ribosyliert.

Aus sterischen Gründen ist nur eine der beiden α -Untereinheiten der Reaktive zugänglich. Alterierendes und modifizierendes Enzym reagieren mit derselben Stelle an α , wahrscheinlich sogar mit derselben Aminosäure.

Da die Akzeptorkapazität der Proteine mit steigendem Argininhalt zunimmt, und da Poly-L-Lysin kein Substrat ist, kann man mit hoher Wahrscheinlichkeit annehmen, daß ein Arginin den ADP-Riboserest in alteriertem α trägt.

2.6. Analyse der Alterationsreaktion

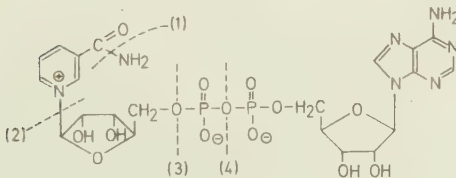
Nachdem von Goff und Weber 1970 (28) kovalent gebundenes Phosphat und Adenin in der α -Untereinheit der modifizierten Polymerase nachgewiesen worden war, und von Seifert et al. 1972 (29) "nicht weniger" als 2 Phosphatgruppen pro α bestimmt wurde, zeigte Goff 1974, daß durch einen Extrakt aus T4-infizierten Zellen Phosphate und Adenosin in Form einer ADP-Ribosegruppe mit der α -Untereinheit verknüpft werden. Aus Goffs Ergebnissen geht nicht eindeutig hervor, ob es sich dabei um Modifikation oder Alteration der RNA-Polymerase handelt.

Nach der Isolierung des Alterationsenzym, konnte die Struktur des Restes, der in der Reaktion übertragen wird, untersucht werden.

2.6.1. Struktur des übertragenen Restes

NAD^+ ist das Substrat des alterierenden Enzyms. Man könnte sich vorstellen, daß bei der Alteration das gesamte NAD^+ -Molekül auf die Akzeptorproteine über-

Abb. 11



tragen wird (1) in Abb. 11, oder daß ein Adenosindiphosphat- (2) bzw. ein Adenosindiphosphoriboserest (3) eingeführt wird.

Die erste Möglichkeit wurde ausgeschlossen, indem NAD^+ , das nicht wie üblich im Adeninrest, sondern im Nicotinamidrest radioaktiv markiert war, in die Alterationsreaktion eingesetzt wurde: Aus diesem Substrat wurde keine Radioaktivität auf RNA-Polymerase und andere Akzeptorproteine übertragen.

Bei der Reaktion wurde radioaktives Nicotinamid freigesetzt. Das Entstehen von freiem Nicotinamid und die Abnahme von NAD^+ im Laufe der Reaktion wurden verfolgt, indem zu verschiedenen Zeiten Aliquote der Reaktion entnommen und NAD^+ und Nicotinamid dünn-schichtchromatographisch voneinander getrennt wurden. Anschließend wurde die Radioaktivität in der Position von NAD^+ bzw. Nicotinamid bestimmt (Abb. 12).

Durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie mit 2 verschiedenen Lösungsmittelsystemen konnte bewiesen werden, daß in der Alterationsreaktion weder Nicotinamid-Ribose noch Nicotinamidmononucleotid (Nicotinamid-Ribosephosphat), sondern Nicotinamid entsteht (Abb. 13).

Durch die Identifizierung des Reaktionsproduktes Nicotinamid in einem Chromatographiesystem, in dem Nicotinamid von Nicotinamid-Ribose und NMN abgetrennt werden kann, wurde bewiesen, daß bei der Alteration ein ADP-Riboserest übertragen wird.

Das am besten untersuchte Beispiel einer ADP-Ribosylierung ist die durch das Diphtherietoxin katalysierte Reaktion (49). Das Exotoxin von Corynebacterium diphtheriae ADP-ribosyliert den Elongationsfaktor 2 (EF 2) eucaryontischer Zellen. EF 2 ist für die Elongation der Peptidketten an den Ribosomen erforderlich. Durch diese Reaktion wird der Elongationsfaktor inaktiviert.

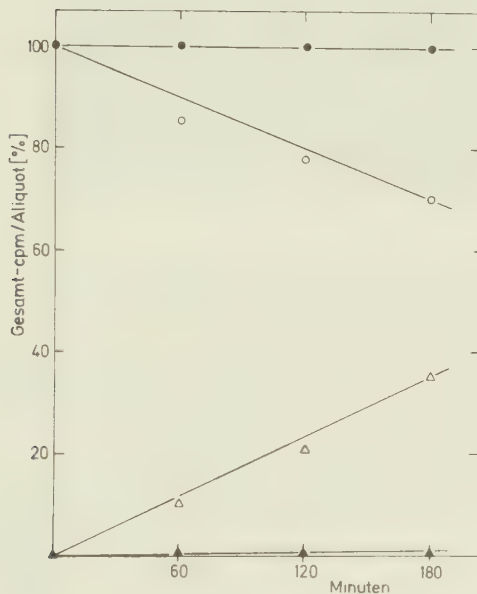
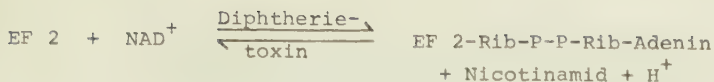


Abb. 12: Entstehung von Nicotinamid und Verbrauch von NAD⁺ während der Alterationsreaktion

Aus Standardansätzen mit Carbonyl-¹⁴C-NAD⁺ (50 Ci/M) als Substrat wurden zu den angegebenen Zeiten 5 µl Aliquote entnommen und auf Cellulosedünnschichtplatten mit Laufmittel A analysiert. NAD⁺ und Nicotinamid wurden als Referenz jeweils auf dieselbe Stelle aufgetragen. Die Cellulose wurde in etwa 2 cm breiten Abschnitten abgekratzt. Die Radioaktivität in den Abschnitten wurde bestimmt.

Die Radioaktivität in der Position von NAD⁺ bzw. Nicotinamid wird als prozentualer Anteil der Gesamtradioaktivität des Aliquots angegeben.

●-● NAD⁺ ▲-▲ Nicotinamid Kontrollinkubation ohne Transferase
○-○ NAD⁺ Δ-Δ Nicotinamid Inkubation mit Transferase

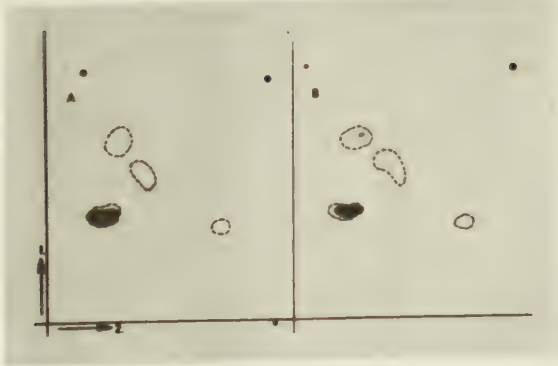


Abb. 13: Identifizierung der bei der Alterationsreaktion entstehenden Spaltprodukte von (Carbonyl- ^{14}C)- NAD^+ durch 2-dimensionale Dünnschichtchromatographie

Aus einer Standardreaktion (B) mit (Carbonyl- ^{14}C)- NAD^+ als Substrat und einer Kontrollinkubation (A) ohne zugesetzte Transferase, wurden 2 μl Aliquots entnommen und direkt auf Cellulosedünnschichtplatten aufgetragen. NAD^+ , NMN, Nicotinamid und Nicotinamid-Ribose (durch Phosphataseverdan von NMN erhalten) wurden als Referenz mit aufgetragen. Laufmittel A wurde für die erste, System B für die 2. Dimension verwendet. Der linke obere Fleck ist Nicotinamid, der mittlere ist Nicotinamid-Ribose, der linke der zwei unteren Flecken ist NAD^+ , der rechte ist NMN.

Bei der ADP-Ribosylierung wird Nicotinamid und ein Proton freigesetzt. Die Reaktion ist reversibel: Durch hohe Konzentrationen des Reaktionsprodukts Nicotinamid kann das Gleichgewicht der Reaktion in Richtung der Ausgangsprodukte NAD^+ und EF 2 verschoben werden und somit inaktiver EF 2 reaktiviert werden.

Die Alterationsreaktion wird ebenfalls durch Nicotinamid bei pH 5,8 gehemmt (Abb. 14), wenn dazu auch ein sehr viel höheres Verhältnis von Nicotinamid zu NAD^+ erforderlich ist, als beim Diphtherietoxin. Bei pH 7-8 ist keine Hemmung zu beobachten.

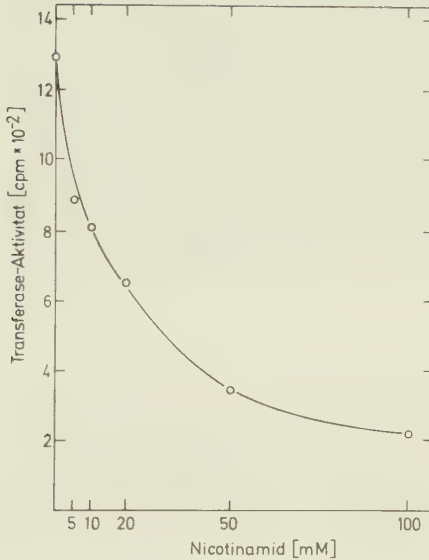


Abb. 14: Hemmung der Alterationsreaktion durch Nicotinamid bei pH 5,8

Die Bedingungen der Reaktion sind wie üblich, mit der Änderung, daß Tris-Maleat-NaOH pH 5,8 als Puffergemisch verwendet und steigende Konzentrationen von Nicotinamid angeboten wurden.

Um die Alterationsreaktion in umgekehrter Richtung ablaufen zu lassen, wurde alteriertes Lysozym, das durch G 50 Sephadex-Gelchromatographie von $^3\text{H-NAD}^+$ und Transferase abgetrennt worden war, in Gegenwart von 50 mM Nicotinamid bei pH 5,8 mit Transferase inkubiert. Die Radioaktivität in Lysozym wurde nach Auftrennung der Reaktionsteilnehmer in einer SDS-Gelelektrophorese bestimmt.

Wie in Tab. 3 zu erkennen ist, nimmt die Radioaktivität in alteriertem Lysozym durch die Inkubation mit Nicotinamid nicht ab.

Tabelle 3: Einfluß von Nicotinamid auf das Gleichgewicht der Alterationsreaktion

Inkubation bei pH 5,8 in Gegenwart von alteriertem Lysozym	Alterations- enzym	Nicotinamid	Radioaktivität in Alterations- enzym	Lysozym (cpm)
+	+	+	39	2343
+	+	-	40	2464
+	-	+	41	2294

5 µg alteriertes Lysozym (^3H -markiert s. Material und Methoden) wurde in 50 mM Tris-Maleat-NaOH-Puffer pH 5,8 mit 0,7 µg Alterationsprotein in Gegenwart von 90 mM Nicotinamid 2 Stunden bei 15°C inkubiert. In Kontrollinkubationen wurden Nicotinamid bzw. Alterationsenzym nicht zugefügt. Die Ansätze wurden nach der Inkubation auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Radioaktivität in der angefärbten Lysozym-Bande und in Alterationsenzym wurde bestimmt.

Die Alterationsreaktion ist unter den untersuchten Bedingungen nicht reversibel.

Es wurde versucht, die mit dem radioaktiven Rest beladene Aminosäure aus dem alterierten Protein durch Hydrolyse mit Proteasen zu isolieren.

Poly-L-Arginin wurde mit $(\text{U-}^{14}\text{C})\text{-NAD}^+$ und Alterationsenzym umgesetzt. Das alterierte Poly-L-Arginin konnte durch Sephadex-Gelchromatographie von $(\text{U-}^{14}\text{C})\text{-NAD}^+$ abgetrennt werden. Anschließend wurde das markierte Poly-L-Arginin über Nacht bei 37°C mit Trypsin, Proteinase K und Trypsin verdaut.

Die entstandenen Produkte konnten durch Elektrophorese in Pyridinacetat pH 4,5 auf Kieselgelplatten aufgetrennt werden (Abb. 15).

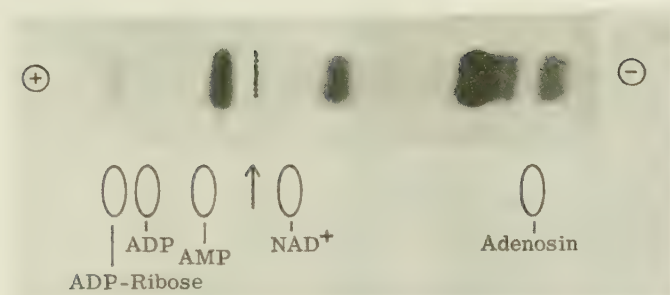


Abb. 15: Elektrophoretische Auftrennung der im Proteaseverdau von alteriertem Poly-L-Arginin entstandenen Produkte

100 µg alteriertes Poly-L-Arginin wurde in 30 mM Tris-Puffer pH 7,5 in Anwesenheit von 1 mM CaCl₂ mit 10 µg Pronase, 10 µg Proteinase K und 2 µg Trypsin bei 37°C für 12 Stunden inkubiert (Gesamtvolumen 50 µl). Der Ansatz wurde konzentriert, auf eine Kieselgelplatte aufgetragen und in 10% Pyridinacetat pH 5,4 bei 600 V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Referenz wurde NAD⁺, ADP, ADP-Ribose, AMP und Adenosin aufgetragen. Das Autoradiogramm wurde für 1 Tag exponiert.

Neben verschiedenen radioaktiv markierten Peptiden erscheinen geringe Mengen eines Produkts, das schneller als ADP zur Anode wandert. Es zeigt dieselbe Beweglichkeit im elektrischen Feld wie ADP-Ribose.

Diese Verbindung wurde aus der Elektrophoreseplatte eluiert und dünnschichtchromatographisch analysiert. Auf Polyäthylenimincelluloseplatten erreicht man mit Natriumformiatpuffern steigender Molarität (50) eine ausgezeichnete Trennung von ADP und ADP-Ribose.



Abb. 16: Dünnschichtchromatographische Identifizierung eines beim Protease-Abbau von alteriertem Poly-L-Arginin entstandenen Produkts

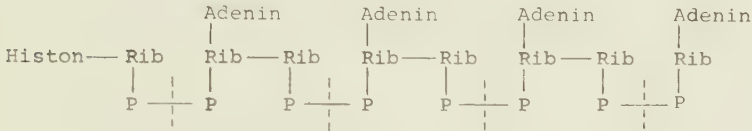
Die Substanz, die in der Elektrophorese (Abb. 15) dieselbe Beweglichkeit wie ADP-Ribose gezeigt hatte, wurde mit H_2O aus der Kieselgelplatte eluiert und auf eine PEI-Selindoloseplatte aufgetragen. Die Platte wurde mit Natriumformiatpuffer entwickelt (50). ADP und ADP-Ribose wurden als Referenz zusammen mit der Substanz aufgetragen. Das Chromatogramm wurde in Streifen geschnitten. Die Radioaktivität in den Streifen wurde in Toluol-scintillator bestimmt.

Es stellte sich heraus, daß sich diese Substanz auch in diesem Chromatographiesystem wie ADP-Ribose und nicht wie ADP verhält (Abb. 16).

Diese Verbindung wird auch während einer Inkubation bei $37^{\circ}C$ in Abwesenheit von Proteasen freigesetzt.

Es wurde also bewiesen, daß durch isoliertes Alterationsprotein ADP-Ribosereste abgebaut werden, dieselbe Gruppe, die auch in Extrakten aus T4-infizierten Zellen (31) in die α -Untereinheit der RNA-Polymerase eingeführt wird. Nach der Enzymnomenklatur lautet die Bezeichnung für das Enzym NAD^+ : Protein ADP-Ribosyltransferase.

Die aus eucaryontischen Zellen isolierten ADP-ribosylierenden Enzyme (51), synthetisieren Poly-ADP-Ribose-Moleküle mit Kettenlängen von 5 bis 50 ADP-Riboseresten. Poly-ADP-Ribose ist kovalent mit Kernproteinen, wahrscheinlich Histonen, verknüpft.

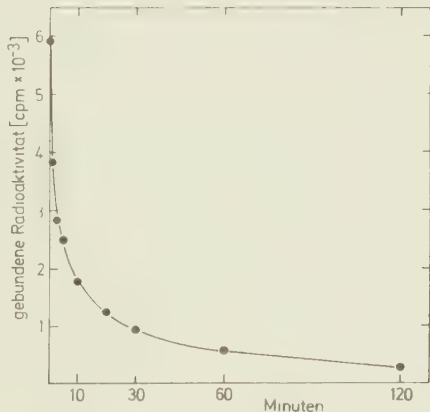


Inkubiert man Poly-ADP-ribosylierte Proteine mit Phosphodiesterase so entsteht Phosphoribosyl-AMP (2'-(5'-Phosphoribosyl)-5'AMP) und ein terminales AMP. Enthält ein Protein nur einen ADP-Riboserest, wie z.B. der inaktive, ADP-ribosylierte Elongationsfaktor 2, so erhält man nur AMP.

Bei der Spaltung mit Phosphodiesterase wird die Markierung des ADP-Riboserestes aus alteriertem Lysozym entfernt. In Abb. 17 ist die Kinetik der Phosphodiesterase-Spaltung aufgetragen.

Abb. 17: Freisetzung von Radioaktivität während der Inkubation von alteriertem Lysozym mit Schlangengift-Phosphodiesterase

200 μ l alteriertes Lysozym wurde mit 12,5 μ g Schlangengift-Phosphodiesterase inkubiert. 20 μ l Aliquote wurden entnommen und mit 5%iger TCA präzipitiert in Gegenwart von 0,1 mg/ml BSA.



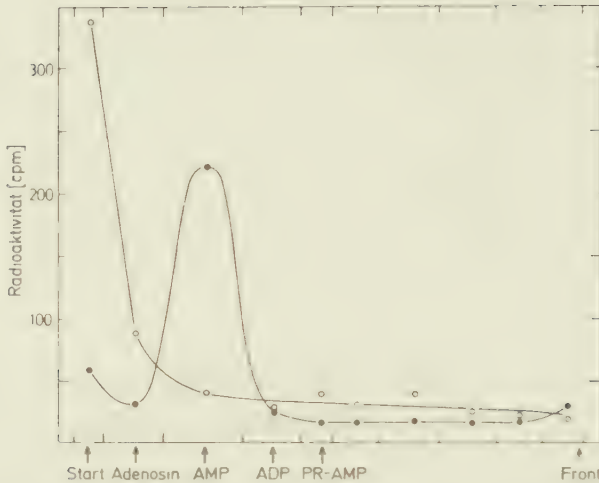


Abb. 18: Dünnschichtchromatographische Identifizierung der Produkte die bei der Inkubation von alterierten Lysosomen mit Schlangengift-Phosphodiesterase freigesetzt werden

Aus der in Abb. 17 beschriebenen Inkubation wurden 3 μ l Aliquote entnommen und auf Celluloseplatten analysiert wie in Material und Methoden beschrieben. ADP, AMP und Adenosin wurden als Referenz auf dieselbe Stelle aufgetragen. Laufmittelsystem B wurde verwendet. Die Position von Phosphoribosyl-AMP wurde aus dem beschriebenen [141] Chromatogrammverhalten berechnet.

- o-o Inkubation ohne Phosphodiesterase (1 Stunde)
- Inkubation mit Phosphodiesterase (1 Stunde)

Das abgespaltene Produkt wurde in 2 Dünnschichtchromatographiesystemen analysiert und als 3 H-AMP charakterisiert (Abb. 18).

Phosphoribosyl-AMP konnte nicht nachgewiesen werden.

Das Alterationsenzym ist kein Poly-ADP-ribosylierendes Enzym. Es überträgt auf eine Aminosäure nur jeweils einen ADP-Riboserest.

2.6.2. Bindung zwischen ADP-Ribose und Protein

Nachdem wir gezeigt hatten, daß in der Alterationsreaktion ein ADP-Riboserest auf Arginin übertragen wird, wandten wir uns der Frage zu, auf welche Art diese Moleküle miteinander verbunden sind. Die Carboxyl- oder die Guanidgruppe des Arginins könnten sowohl mit der Ribose als auch mit den Phosphaten der ADP-Ribose verknüpft werden.

Die Carboxylgruppe des Arginins ist für die Reaktion nur am Carboxylende des Proteins zugänglich. Da die Sequenz des carboxyterminalen Endes der α -Untereinheit Arg-Gly-COOH lautet (Fujiki, persönliche Mitteilung), ist eine ADP-Ribosylierung der Carboxylgruppe des Arginins während der Alteration auszuschließen. Außerdem ist in Kapitel 2.5. gezeigt worden, daß z.B. in Lysozym und Salmin A1 weit mehr als 1 ADP-Riboserest pro Proteinmolekül eingeführt wird.

- So bleibt nur noch die Entscheidung zwischen zwei Möglichkeiten:
1. Der Guanidinrest des Arginins wird mit einer Phosphatgruppe des ADP-Riboserestes zu einem Phosphoamid umgesetzt.
 2. Es entsteht ein Guanidinribosid. An die Stelle des Ringstickstoffs des Nicotinamids tritt ein Stickstoff des Guanidinrestes.

Untersuchungen an synthetischen Adenyl(5'-N)peptiden (52) und an AMP-Lysin in AMP-Ligase (44) ergaben, daß die P-N-Bindung in 5'Phosphoamiden alkalistabil und säurelabil ist ($t_{1/2}$ in 0.3 n HCl bei 37°C ist 15 Minuten). Zur Charakterisierung der Phosphoamidbindung wurde auch Hydroxylamin als Reagens eingesetzt: Neutrales Hydroxylamin spaltet Ester und Anhydride sehr rasch (53), während es mit Phosphoamiden viel langsamer reagiert.

Ist der ADP-Riboserest über eine Phosphatgruppe an Arginin gebunden, sollte er die angeführten Stabilitätseigenschaften besitzen.

Lysozym wurde in vitro ADP-ribosyliert und in 0,25 n NaOH 0,25 n HCl, 4 M NH_2OH pH 7,5, oder TMA-Puffer bei 66°C inkubiert. Der Anteil der noch in Lysozym verbliebenen ADP-Ribosereste wurde durch TCA-Fällung des Lysozyms und Bestimmung der Radioaktivität des Präzipitats ermittelt (Abb. 19).

Abb. 19: Freisetzung von Radioaktivität aus alteriertem Lysozym durch HCl, NaOH und NH_2OH

100 µl alteriertes Lysozym wurde 10fach mit 0,25 n HCl oder 0,25 n NaOH oder 0,44 M $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ pH 7,5 oder TMA-Puffer verdünnt und bei 66°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden 100 µl Aliquote entnommen und mit 5%iger TCA in Gegenwart von 0,1 mg/ml BSA gefällt. Inkubation mit HCl ●, NaOH ○, NH_2OH △, TMAG ▲



Bevor auf die Ergebnisse eingegangen wird, müssen zwei Anmerkungen zur Methode gemacht werden: 1. In ADP-Riboserest trägt Adenin die radioaktive Markierung. Die Bindung dieser Markierung an Lysozym wurde als Maß für die Stabilität der Arginin-ADP-Ribose-Bindung gesetzt. Dieses Vorgehen ist zulässig, da

der ADP-Riboserest selbst alkalistabil ist und auch von NH_2OH nicht angegriffen wird (51). Die Abspaltung der Markierung durch Säure kann zum geringen Teil durch Depurinierung verursacht werden. Dies spielt jedoch für die nachfolgende Beweisführung keine Rolle.

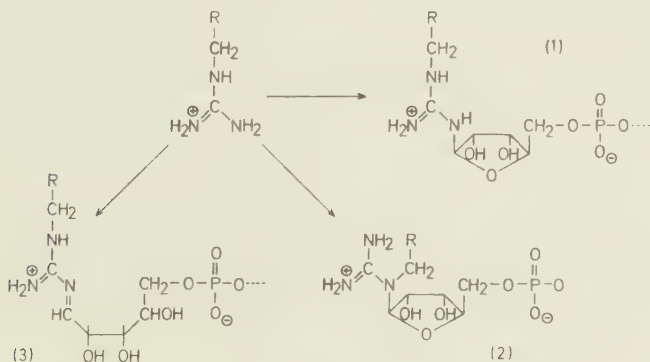
2. Es ist bekannt, daß Arginin unter den Bedingungen der alkalischen Hydrolyse von Proteinen (54) zu Ornithin und Harnstoff zerlegt wird. Von verschiedenen Autoren wurde jedoch gezeigt, daß die Hydrolyse von Arginin in 0,25 n NaOH in den von uns untersuchten Zeiträumen vernachlässigt werden kann (55,56,57).

Das Ergebnis widerspricht (Abb. 19) ganz eindeutig der Annahme einer Phosphoamidbindung zwischen ADP-Ribose und Arginin: Der ADP-Riboserest des alterierten Lysozyms wird von NaOH sehr viel schneller abgespalten ($t_{1/2}$ 3 Min) als von HCl ($t_{1/2}$ 17 Min) und wird außerdem von neutralem NH_2OH ($t_{1/2}$ 7 Min) angegriffen.

Die Vorstellung einer direkten Bindung des Phosphors an ein C-Atom des Arginins kann ebenfalls aus Stabilitätsgründen ausgeschlossen werden (58).

Die Verknüpfung von ADP-Ribose und Arginin erfolgt also über eine N-Ribosidbindung.

Es gibt drei verschiedene Möglichkeiten dieser N-Ribose-Bindung:



Der dritte Strukturvorschlag scheidet aus: Die Azomethinbindung wäre eher säure- als alkalilabil und zudem würde die Resonanz der Guanidiniumgruppe stark beeinträchtigt. Außerdem liegen alle bekannten Aminoglycoside als Halbacetate und nicht als Schiff'sche Basen vor (59).

Der ADP-Riboserest ist demnach als N-Ribosid entweder mit einem terminalen Stickstoff (Struktur 1) oder dem sekundären Stickstoff (Struktur 2) verknüpft.

Die N-Ribosidbindung ist viel labiler als die bekannten N-Glycosidbindungen in Glycoproteinen. Diese Bindungen sind völlig alkalistabil und auch relativ säurestabil ($t_{1/2}$ in 2 n HCl bei 100°C ist 17 Min) (60).

Die N-Ribosidbindung in NAD^+ ist jedoch auch extrem alkalilabil (61), während sie gegenüber Säure beständiger ist. Die Eigenschaften von Arginyl-Ribosid und Nicotinamid-Ribosid sind also sehr ähnlich.

An dieser Stelle soll kurz die ADP-Ribose-Protein-Bindung in alterierten Proteinen mit den Bindungen in ADP-Ribose-EF 2 und Poly-ADP-ribosyliertem Histon verglichen werden.

Der Poly-ADP-Ribose-Rest wird durch verdünnte Natronlauge und neutrales Hydroxylamin sehr rasch abgespalten ($t_{1/2}$ in 0,1 n NaOH bei 0°C 2 Minuten). Als Verknüpfung kommt deshalb nur eine Esterbindung in Frage (62).

ADP-ribosylierter EF 2 wird durch neutrales Hydroxylamin nicht angegriffen (62). Die Aminosäure, mit der ADP-Ribose verknüpft ist, hat man in beiden Fällen nicht identifizieren können.

Somit ist die Alteration das einzige Beispiel einer ADP-Ribosylierung, bei dem bekannt ist, an welche Aminosäure der ADP-Riboserest gebunden ist.

2.7. Alterationsgen

Die alterationslose Mutante T4"ac-q"alt⁻ ist eine Doppelmutante (18). Die Mutation in "ac" führt zur Resistenz der Phagenvermehrung gegenüber 0,25 µg Acriflavin/ml im Nährmedium. Durch die zusätzliche Mutation in q wird diese Resistenz verstärkt (63). Die q-Mutation liegt im Gen 17 des T4-Phagen. Das Produkt des Gens 17 ist für einen der letzten Schritte des Zusammenfügens der Phagenvorstufen essentiell. Die Lokalisation der "ac" Mutation auf der Genkarte des T4-Phagen steht noch aus. Das "ac"-Genprodukt verändert die Permeabilität der E. coli-Zellmembran für Acridinfarbstoffe (64).

Horvitz zeigte, daß T4-Phagen, die nur in "ac" bzw. nur in Gen 17 mutiert sind, weiterhin die RNA-Polymerase nach der Infektion alterieren können. Die untersuchten 17⁻-Mutanten sind im Gegensatz zu den "ac"-Mutanten keine Punktmutanten, sondern temperatursensitive oder "pseudo-amber" Mutanten. Alle konnten unter restriktiven Bedingungen (also bei hoher Temperatur bzw. in E. coli B Stämmen, die keine Suppressor-t-RNA besitzen) die RNA-Polymerase alterieren. Da die Phagen für die Infektion jedoch unter permissiven Bedingungen gewonnen wurden, enthielten sie das Produkt des Gens 17, also das mögliche Alterationsprotein. Da das Alterationsprotein bei der Infektion in die Zelle injiziert wird und die RNA-Polymerase alteriert, wird man in Zellen, die mit 17⁻-Phagen infiziert worden sind alterierte Polymerase finden, auch wenn das Produkt des Gens 17 mit dem Alterationsgen identisch ist.

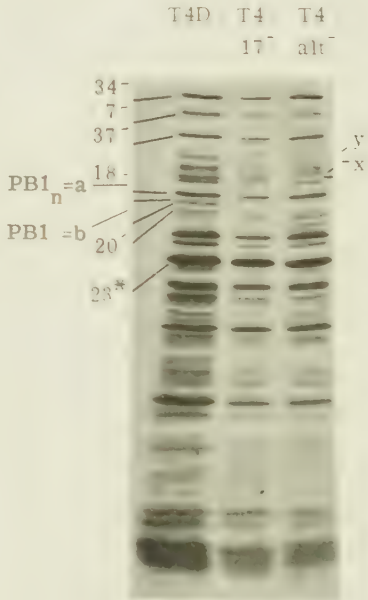
Wir konnten also als Arbeitshypothese annehmen: Gen 17 ist das Alterationsgen. Durch die zusätzliche Mutation in "ac" wird T4 alt⁻ befähigt, sich zu vermehren (17⁻-Mutanten liefern nur Phagenvorstufen in den infizierten Zellen). Diese Vorstellung wurde gestützt durch das Ergebnis von

Vanderslice (65), daß das Produkt des Gens 17 dieselbe Größe besitzt wie das alt-Protein.

Zur Bestätigung dieser Hypothese analysierten wir die T4-Proteine, die in infizierten Zellen synthetisiert wurden, auf SDS-Polyacrylamidgelen (65). Die Proteinmuster nach Infektion mit T4D, T4^{ac-q} alt⁻ und T4 amber17 (unter restriktiven Bedingungen) wurden verglichen (Abb. 20).

Abb. 20: Identifizierung später T4-Proteine auf SDS-Polyacrylamidgelen

E. coli B wurde mit T4D⁺, T4 amber17 und T4 alt⁻ infiziert. Die Proteine der infizierten Zellen wurden nach Vanderslice (65) zwischen 18 und 26 Minuten nach Infektion radioaktiv markiert. Nach Aufschluß der Zellen im Lämmli-Proben-Puffer wurden die Proteine in einem exponentiellen SDS-Polyacrylamidgradientengel aufgetrennt. Die Identifizierung der Banden erfolgte durch Vergleich mit Gelen von Kellenberger (41).



In dem Molekulargewichtsbereich zwischen Genprodukt 18 und 20, wo nach Vanderslice Genprodukt 17 und 31 sein soll, wurden bei Infektion mit T4D 2 Banden beobachtet. Wir bezeichnen sie als a und b. In alt⁻-infizierten Zellen fehlt b während a vorhanden ist.

In alt^- -infizierten Zellen fehlt außerdem ein Protein mit größerem Molekulargewicht (x) und ein zusätzliches Protein (y) tritt auf.

Wir interpretieren das Ergebnis folgendermaßen: Protein a ist das Produkt des Gens 17. Protein b ist das Alterationsprotein. Das Alterationsprotein wird in einem proteolytischen Prozeß aus einem Vorläuferprotein gebildet (18). Möglicherweise ist das Vorläuferprotein mit x identisch. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß das Gen für das Protein x (bzw. y) nicht mit dem Alterationsgen identisch ist und einen anderen Mutationsort in der DNA von T4"ac-q" darstellt.

Nach Vanderlice ist Protein b, das wir als Alterationsprotein identifizierten, das Produkt des Gens 31. Dies scheint nunmehr unwahrscheinlich zu sein, da das Produkt des Gens 17 im Gegensatz zum Alterationsprotein essentiell ist. Das Alterationsprotein fehlt in 31^- -infizierten Zellen (Kellenberger, persönliche Mitteilung), vermutlich da die Spaltung des Vorläuferproteins nicht möglich ist. (In 31^- -infizierten Zellen ist auch die Spaltung $P23 \rightarrow P23^*$ unterbunden.)

Die Banden a und b wurden schon von Coppo (66) und Kellenberger (pers. Mitteilung) beschrieben und als $PB1_n$ (a) und $PB1$ (b) bezeichnet. $PB1_n$ soll das Vorläuferprotein von $PB1$ sein.

In T4D und in $T4\text{alt}^-$ ist jedoch Protein a in gleicher Menge vorhanden (Abb. 20). Man müßte also annehmen, daß in $T4\text{alt}^-$ -infizierten Zellen a nicht in b gespalten werden kann. Da in 17^- -infizierten Zellen nur noch b vorhanden ist, müßte man nach Coppo und Kellenberger annehmen, daß das Produkt des Gens 17 die Umwandlung von a in b verhindert.

Da so viele Annahmen gemacht werden müssen, um die Vorstellung einer Vorläuferbeziehung zwischen a und b aufrecht zu erhalten, halten wir diese Hypothese für nicht sehr wahrscheinlich.

Nach Horvitz (18) ist das Vorläuferprotein des Alterationsenzym^s außerdem sehr viel größer als PBl_n .

Die Vorläuferbeziehung zwischen diesem Protein und dem Alterationsprotein wurde jedoch ebenfalls nicht bewiesen.

Es bleibt somit unbekannt, welches Gen für das Alterationsprotein codiert und welche Größe das Vorläuferprotein besitzt.

2.8. Nachweis des Alterationsenzym^s in T4-infizierten Zellen

In den vorausgegangenen Kapiteln wurde bewiesen, daß isoliertes Alterationsenzym PNA-Polymerase in vitro alterieren kann. Die in vitro alterierte α -Untereinheit ist von in vivo alterierter bzw. modifizierter α -Untereinheit nicht zu unterscheiden. Daraus wurde abgeleitet, daß das Alterationsprotein bei der Infektion in die Zelle eingeschleust wird.

Im nächsten Abschnitt soll gezeigt werden, daß man das alt-Protein in T4-infizierten Zellen nachweisen kann.

In Lysaten von T4-infizierten Zellen (2 Minuten nach Infektion geerntet), wurde eine Aktivität gefunden, die, wie osmotisch geschockte Phagen, aus NAD^+ einen Rest auf RNA-Polymerase überträgt. Der Rohextrakt ADP-ribosyliert neben der α -Untereinheit der Polymerase auch σ , β und β' wie es für das aus Phagen isolierte Alterationsenzym typisch ist. Für diese Analyse wurde die im Rohextrakt ADP-ribosylierte RNA-Polymerase mit Antikörper gefällt. Das Präzipitat wurde durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Bei der Elektrophorese in SDS werden die Untereinheiten von den L- und H-Ketten der γ -Globuline getrennt und man kann die Radioaktivität in den Untereinheiten bestimmen.

In Zellen, die mit T4alt⁻ infiziert wurden, war keine Aktivität nachzuweisen. In Extrakten aus Zellen, die mit T4mod⁺, T4mod⁻ oder T4D infiziert wurden, war das Alterationsenzym vorhanden (Tab. 4).

Tabelle 4: Transferaseaktivität in halbgereinigten Rohextrakten aus E. coli-Zellen, die mit verschiedenen T4-Stämmen infiziert worden waren

Alterationsaktivität	
Verwendeter T4-Stamm	TCA-fällbare Radioaktivität (cpm)
T4 ⁺	2037
T4alt ⁻	152
T4mod ⁻	7873
T4mod ⁺	2486

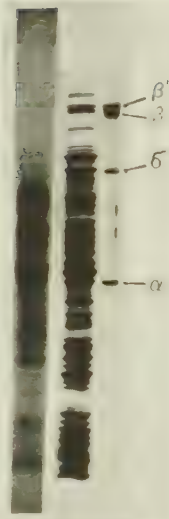
Die Reaktionsansätze (100 µl Gesamtvolumen) enthielten 125 µg Protein angereicherte Enzymfraktion (Ammoniumsulfatfällungen von Rohextrakten) 35 µg RNA-Polymerase und 0,25 mM NAD⁺-³H (400 000 cpm) in TMAG-Puffer. Nach Inkubation bei 30°C für 15 Minuten wurden die Proteine mit 5%iger TCA gefällt und gewaschen. Die Radioaktivität in den TCA-gefällten Proteinen wurde in einem Flüssigkeitsscintillationszähler bestimmt.

In einem Rohextrakt werden viele Proteine ADP-ribosyliert. Die Untereinheiten der RNA-Polymerase werden nicht bevorzugt alteriert (Abb. 21).

Die Kinetik des Auftretens der Aktivität nach Infektion wurde untersucht (Abb. 22). Das Maximum der Aktivität ist eine Minute nach Infektion.

Abb. 21: In vitro-Alteration der
Proteine von Rohextrakten aus
E. coli-Zellen

Der Reaktionsansatz (50 μ l) enthielt 0,5 μ g Alterationsenzym, 50 μ g der Rohextraktproteine (s. Methoden l.c.) und 14 C-NAD $^{+}$ (270 Ci/M). Nach der Inkubation (12 Stunden, 15 $^{\circ}$ C) wurden die Proteine durch Elektrophorese auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.
links: Autoradiographie
rechts: Coomassie-Färbung



Das Alterationsenzym wurde aus T4 $^{+}$ -infizierten Zellen angereichert, die 2,5 Minuten nach Infektion geerntet worden waren. Die Aktivität eines Rohextrakts von infizierten, phagenfrei gewaschenen Bakterien wird durch Abzentrifugieren der Zelltrümmer nicht verringert. Da Phagen und Phagentrümmer dabei ebenfalls abgetrennt würden, kann man ausschließen, daß die Aktivität von Phagenpartikeln herrührt.

Während der Anreicherung verhielt sich die Aktivität in der Biogel A-1,5 m-Gelchromatographie und der DEAE-Cellulose-Chromatographie wie die aus Phagen isolierte Transferase. Sie adsorbierte auch nicht an Phosphocellulose.

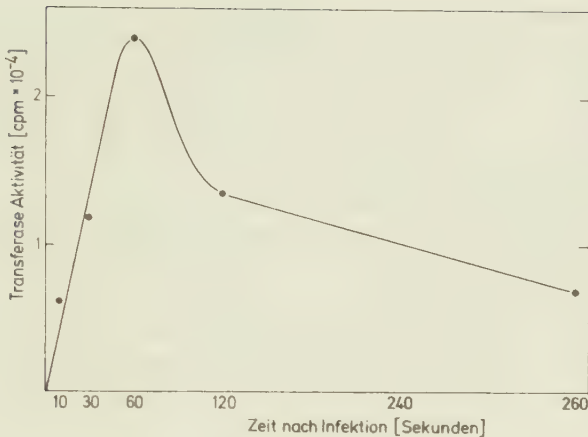


Abb. 22: Kinetik des Auftretens von Alterationsaktivität in der Zelle nach Infektion durch den Phagen T4

Zu verschiedenen Zeiten nach Infektion wurden Zellen einer 14-Liter-Kultur geerntet. Die Alterationsaktivität im Rohextrakt dieser Zellen (s. Methoden l.c.) wurde im Standardtest bestimmt. Jeder Inkubationsansatz enthielt 340 µg Protein aus dem Rohextrakt.

Nach der DEAE-Cellulose-Chromatographie konnte die Transferase-Bande eindeutig im SDS-Polyacrylamidgel identifiziert werden, auch wenn die Präparation auf dieser Anreicherungsstufe noch andere Proteine als Verunreinigung enthielt.

Diese Präparation alteriert die Untereinheiten der RNA-Polymerase im gleichen Verhältnis wie das aus dem Phagen isolierte Enzym.

Da im Fall der Infektion mit T4mod⁻ sehr hohe Transferaseaktivität, dagegen bei der Infektion mit T4alt⁻ keine Aktivität im Rohextrakt festgestellt wurde, muß es sich um alterierendes und nicht um modifizierendes Enzym handeln.

Ein Protein, das bei der Phageninfektion mit der DNA in die Zelle eingebracht wird, sollte dort sofort nach Infektion nachzuweisen sein. Die Kinetik des Erscheinens der Alterationsaktivität in der Zelle nach Infektion entspricht dieser Vorstellung: Maximale Aktivität wird eine Minute nach Infektion beobachtet. Schon 30 Sec. nach Infektion findet man halbmaximale Aktivität (Abb. 22). Da die Adsorption der Phagen eine gewisse Zeit in Anspruch nimmt, ist zu erwarten, daß nach 10 Sec. noch wenig Transferaseaktivität in den Zellen vorhanden ist.

Die Eigenschaften des aktiven Prinzips, das man aus den infizierten Zellen (2,5 Min. nach Infektion) isoliert, sind identisch mit den Eigenschaften des aus Phagen isolierten Alterationsenzym.

Wir schließen aus diesen Ergebnissen, daß in den infizierten Zellen Alterationsprotein vorhanden ist, das bei der Infektion in die Bakterienzelle eingebracht worden ist.

Goff zeigte 1974 (31), daß RNA-Polymerase in Rohextrakten aus T4-infizierten Zellen ADP-ribosyliert wird. Er beobachtete, wie es für die Alteration charakteristisch ist, daß nur 50% der α -Untereinheiten umgesetzt werden (67).

Die maximale Transferaseaktivität wurde in seinem System 2 Minuten nach Infektion bei 30°C gemessen, also zu einem Zeitpunkt, an dem die Modifikation eben erst beginnt, jedoch die Alteration ihr Maximum schon erreicht hat (18). Wir konnten 2 Minuten nach Infektion in Zellen, die mit T4mod⁻ infiziert worden waren, hohe Aktivität nachweisen, jedoch keine Aktivität in T4alt⁻-infizierten Zellen. Die genannten Ergebnisse deuten darauf hin, daß Goff in den Rohextrakten alterierendes Enzym untersucht hat und nicht, wie er behauptet, modifizierendes Enzym.

Weshalb Goff ausschließlich ADP-Ribosylierung in α findet, während in unseren Analysen, auch wenn sie unter Goffs Bedingungen durchgeführt wurden, immer auch alteriertes α , β und β' zu sehen ist, bleibt unverständlich.

Das Alterationsenzym ADP-ribosyliert Proteine, die zugängliche Argininreste besitzen (Kap. 2.5.) und so ist es nicht Überraschend, daß viele Zellproteine in einem Rohextrakt alteriert werden (Abb. 21).

Es ist also möglich, daß die Polymerase nicht der eigentliche Angriffspunkt des alterierenden Enzyms ist.

Da jedoch alterierendes und modifizierendes Enzym dieselbe Stelle in der α -Untereinheit ADP-ribosylieren, ist es sehr wahrscheinlich, daß die Alteration wie die Modifikation auf der Transcriptionsebene - über die RNA-Polymerase - in den Stoffwechsel der T4-infizierten E. coli-Zelle eingreift.

2.9. Transcriptionseigenschaften der alterierten Polymerase

Die Transcriptionseigenschaften der RNA-Polymerase ändern sich nach der Infektion durch den Phagen T4 ohne daß dazu die Synthese eines Phagengen-abhängigen Proteins erforderlich ist. Die alterierte Polymerase überschreibt im Gegensatz zu Polymerase aus uninfizierten Zellen Kalbsthymus-DNA besser als T4-DNA (10). Die isolierte alterierte Polymerase enthielt in diesen Versuchen nur wenig σ . Da aber die σ -Untereinheit nur in katalytischen Mengen zur Initiation der RNA-Synthese benötigt wird, wurde dieser σ -Mangel nicht als Ursache der veränderten Transcriptionspezifität angesehen. Um den Einwand zu entkräften, das σ im alterierten Enzym sei inaktiv gewesen, wurden diese Versuche wiederholt.

Wir isolierten alterierte Polymerase zu verschiedenen Zeiten nach Infektion aus T4-infizierten Zellen (Abb. 23) und bestimmten deren RNA-Synthesekapazität an T4- bzw. Kalbsthymus-DNA. Zu allen Enzymen wurden stöchiometrische Mengen der σ -Untereinheit zugesetzt.

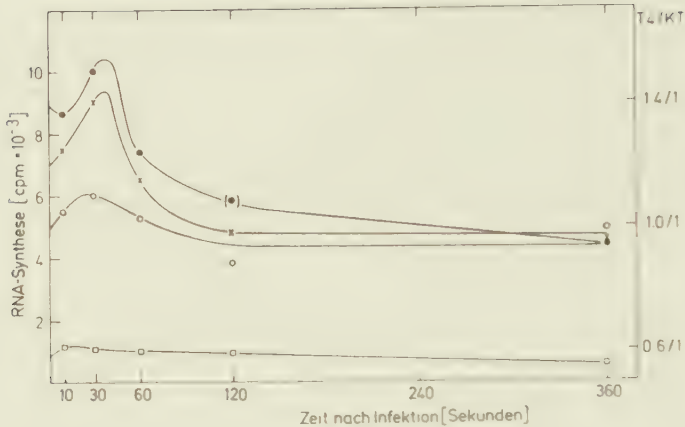


Abb. 23: Analyse des Transcriptionsverhaltens von RNA-Polymerasen, die zu verschiedenen Zeiten nach Infektion isoliert wurden

Zu den angegebenen Zeiten nach Infektion wurden Aliquots einer 14 Liter-Zellkultur entnommen. Nach Aufschluß der Zellen wurde die Polymerase bis nach der DEAE-Cellulose-Schichtgraphie angereichert (137). Die RNA-Synthesekapazität dieser Enzympräparationen an T4-, T7- bzw. an Kalbsthymus-DNA als Matrix wurde in einem Standard-PNA-Synthesensatz (25 µg DNA, 20 µg Polymerase, 5 Ci M ^{14}C -ATP) bestimmt. Allen Enzympräparationen wurde für diesen Versuch stöchiometrische Mengen von σ zugesetzt.

x-x-x-x Aktivität an T4-DNA o-o-o an Kalbsthymus-DNA
 □-□-□ an T7-DNA ●-●-● Verhältnis Aktivität an T4-DNA/
 Aktivität an Kalbsthymus-DNA

Wie in Abb. 23 zu erkennen, treten nicht die erwarteten starken Änderungen in der Transcriptionspezifität im Verlauf der Infektion auf.

Man muß also annehmen, daß die drastische Reduzierung der Transcription an T4-DNA im Vergleich zur Transcription an Kalbsthymus-DNA, die von Seifert beschrieben wurde, auf den Verlust

bzw. die Inaktivierung des σ -Faktors bei der Reinigung der Polymerase, zurückzuführen ist.

Der schnelle Anstieg der Transcriptionsaktivität nach Infektion wurde nicht untersucht. Als Ursache für dieses Phänomen scheint aus zeitlichen Erwägungen nur die Alteration in Frage zu kommen.

Auch an T7-DNA unterscheiden sich alterierte, modifizierte und normale Polymerase nur wenig in ihrer RNA-Synthesekapazität, wenn σ in ausreichenden Mengen vorhanden ist (Abb. 23).

Wenn man normale RNA-Polymerase in vitro mit Alterationsenzym ADP-ribosyliert, so nimmt die Aktivität der Polymerase (an T7-DNA) im Verlauf der Reaktion nur geringfügig ab (Abb. 24). Nach 7-stündiger Inkubation ist die RNA-Polymerase nahezu vollständig alteriert.

RNA-Polymerase, die in vivo oder in vitro alteriert worden ist, überschreibt also T7-DNA fast genauso effektiv wie die Polymerase aus uninfizierten Zellen.

Aus der Literatur ist bekannt, daß der Terminationsfaktor ρ der in vivo und in vitro in bestimmten Transcriptionseinheiten der E. coli DNA zur spezifischen Termination der RNA-Synthese führt, mit alterierter und modifizierter Polymerase noch bei höherer Ionenstärke in Wechselwirkung treten kann (68) als mit normaler Polymerase.

Über die in vitro Transcription von bestimmten E. coli-Genen durch alterierte RNA-Polymerase liegen bislang keine Untersuchungen vor.

Die Bedeutung der Transcriptionseigenschaften der alterierten Polymerase für die Funktion der Alteration wird im nächsten Abschnitt diskutiert.

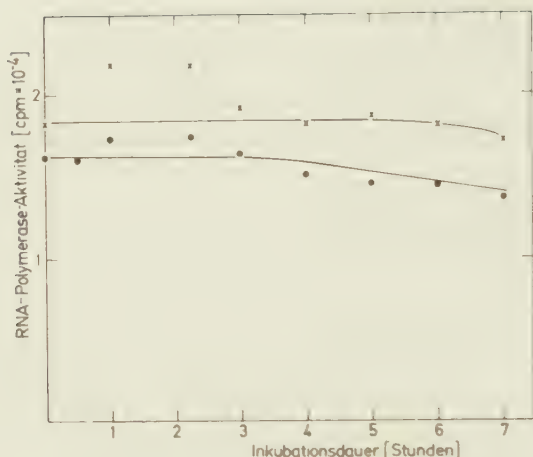


Abb. 24: Einfluß von in vitro Alteration auf die RNA-Synthesekapazität der Polymerase an T7-DNA

70 µg RNA-Polymerase wurde in einem Standardalterationsansatz mit 2,1 µg Alterationsenzym und unmarkierten NAD⁺ bei 15°C inkubiert (100 µl Gesamtvolumen). Zu den angegebenen Zeiten wurden 10 µl Aliquote entnommen und zu einer RNA-Synthese-Ansatz gegeben, der in einem Gesamtvolumen von 250 µl 50 µg T7-DNA enthielt. Inkubationsdauer 10 Minuten bei 37°C. Die Radioaktivität wurde wie üblich bestimmt. In der Kontrollinkubation war kein Alterationsenzym anwesend.

x-x-x Inkubation ohne Alterationsenzym

●-●-● Inkubation mit Alterationsenzym

2.10. Funktion der Alteration

Zu der Frage nach der Funktion des alterierenden Enzyms liegen keine eigenen Untersuchungen vor. Um ein vollständiges Bild der Alteration zu geben, möchte ich dieses Problem trotzdem diskutieren.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, injiziert der T4-Phage bei der Infektion das alterierende Protein zusammen mit der DNA in die Zelle.

Die Aktivität des Enzyms erreicht eine Minute nach Infektion ein Maximum und fällt dann schnell ab. Die Alteration der Untereinheiten der RNA-Polymerase wird 3-5 Minuten nach Infektion durch ein Protein wieder rückgängig gemacht (18). Die Funktion der Alteration ist somit auf diesen kurzen Zeitraum beschränkt.

Unter den Vorgängen, die bei der Infektion durch den Phagen T4 sehr früh in der befallenen Zelle ablaufen, bieten drei Prozesse mögliche Angriffspunkte für die Alteration:

A. Zellmembranänderungen der infizierten Zelle

Schon 2 Minuten nach Infektion kann die Zelle durch einen zweiten Phagen nicht mehr infiziert werden. Die Ursache dafür sind Veränderungen der Zellmembran. Die Permeabilität der Membran gegenüber Acridinfarbstoffen und NADH ist stark erhöht (69,64). Eine Beteiligung des ADP-ribosylierenden Enzyms an diesem Vorgang ist nicht auszuschließen. Die alterierte RNA-Polymerase wäre dann ein Nebenprodukt der Reaktion.

Bekanntlich wird die DNA der Bakterienzelle in einem Membrankomplex repliziert (70). Duckworth (36) diskutiert die Möglichkeit, daß durch Membranveränderungen der Replikationskomplex der E. coli-DNA an der Zellmembran zerstört wird, und daß dadurch die Wirtstranscription zum Erliegen kommt.

Die Alteration könnte somit über eine Membranänderung auch die Transcription beeinflussen.

B. Änderungen der Transcriptionsspezifität an T4-DNA

Die T4-Gene werden nach Infektion in genau festgelegter Reihenfolge ausgeprägt. Die "immediate early" T4-Genprodukte werden schon 30 Sekunden nach Infektion synthetisiert. 1-2 Minuten nach Infektion bei 30°C erscheint eine Klasse von Genprodukten, die als "delayed early" bezeichnet werden. Die Synthese einiger "delayed early" RNA-Ketten beginnt an anderen Promotoren als die der "immediate early" RNA (24).

Im weiteren Verlauf der Infektion wird die Transcription früher Gene gedrosselt und die späten Transcriptionsprodukte treten auf.

Der einzige Transcriptionskontrollprozeß an T4-DNA, der kurz nach der Alteration abläuft, und somit als unmittelbarer Angriffspunkt für die Alteration in Frage kommt, ist die Anschaltung der "delayed early" Gene.

In vitro transkribiert normale (21) und modifizierte Polymerase in Gegenwart sättigender Mengen des σ -Faktors sowohl "immediate early" als auch "delayed early" Gene (72,73) und es ist anzunehmen, daß sich alterierte Polymerase in Anwesenheit von σ gleich verhält (24). Die Alteration hat somit wahrscheinlich keinen Einfluß auf die Ausprägung der "delayed early" Gene.

C. Hemmung der RNA-Synthese an der DNA des Wirtsbakteriums

Nach Infektion der E. coli-Zelle durch den Bakteriophagen T4 wird die Synthese von E. coli-RNA sehr schnell gehemmt. Zwei Vorgänge führen unabhängig voneinander zur Abschaltung der Wirtstranscription.

1. In Abwesenheit von Proteinsynthese wird, in Abhängigkeit von der Zahl der Phagen, die jeweils eine Zelle befallen, - der Multiplizität der Infektion - die m-RNA-Synthese des Wirtsbakteriums weitgehend gehemmt (13,74).

2. Die vollständige Hemmung der m-RNA-Synthese und die Abschaltung der Synthese der stabilen RNA-Klassen (t-RNA, ribosomale RNA) erfordert die Ausprägung eines oder mehrerer Phagene (14,18,19).

Modifizierte RNA-Polymerase kann verschiedene E. coli-Gene in vitro nicht mehr ablesen (33). Deshalb ist anzunehmen, daß das modifizierende Enzym eines der Proteine ist, die für die Abschaltung von stabiler - bzw. m-RNA erforderlich sind.

Für die Abschaltung der Wirts-m-RNA-Synthese in Abwesenheit von Proteinsynthese kommen als mögliche Ursachen neben der schon erwähnten Membranänderung die Konkurrenz von T4-DNA mit E. coli-DNA um die RNA-Polymerase und die Alteration der RNA-Polymerase in Frage.

Um die Zellmembran zu verändern reicht die Anheftung eines Phagen pro Zelle aus (75). Das Ausmaß der Transkriptionshemmung wird jedoch von der Multiplizität der Infektion bestimmt. Aus diesem Grunde ist es sehr unwahrscheinlich, daß Membranänderungen tatsächlich an der Abschaltung der Wirts-m-RNA-Synthese beteiligt sind.

T4-DNA hemmt schon in sehr niedriger Konzentration die Transkription von E. coli-Genen (33). Anscheinend besitzt T4-DNA stärkere Promotoren als E. coli-DNA. Die Konkurrenz zwischen den Promotoren der T4-DNA und der E. coli-DNA um Polymerasemoleküle in der Zelle spielt sicher eine Rolle beim Wechsel der Polymerase von der DNA des Wirtsbakteriums zur T4-DNA.

Die Alteration der RNA-Polymerase läuft zeitlich parallel mit der Abschaltung der Wirtstranskription, ist abhängig von der Multiplizität der Infektion und wurde aus diesen Gründen als Ursache für die Hemmung der Transkription von E. coli-DNA angesehen (35). Alterierte RNA-Polymerase sollte somit nicht mehr in der Lage sein, E. coli-DNA zu transkribieren.

Bislang ist die Fähigkeit alterierter Polymerase bestimmte *E. coli*-Gene in vitro zu überschreiben nicht untersucht worden. Ein signifikanter Unterschied zwischen alterierter und normaler Polymerase ist die verringerte Affinität des alterierten Minimalenzym zum σ -Faktor. An Phagen-DNA zeigt sich jedoch in Anwesenheit des σ -Faktors kein entscheidender Unterschied der Aktivität von normaler und alterierter Polymerase.

Aus in vitro Versuchen gibt es somit keinen eindeutigen Hinweis auf einen Einfluß der Alteration auf die Abschaltung der Wirts-RNA-Synthese.

Die Analyse der Infektion durch alt^- -Phagen und mod^- -Phagen zeigt keinen Unterschied in der Abschaltung der r-RNA-Synthese des Wirtsbakteriums und im Auftreten der T4-Genprodukte im Vergleich zur Infektion mit Wild-Typ T4^+ . Dieser Tatbestand scheint gegen einen Einfluß des alterierenden Enzyms auf die Transcriptionsregulation nach T4-Infektion zu sprechen (18).

Ich halte es trotzdem für wahrscheinlich, daß die Transcription der Angriffspunkt der Alteration ist: Alterationsreaktion und Modifikationsreaktion bestehen in einer Übertragung eines ADP-Riboserestes aus NAD^+ auf dieselbe Stelle in der α -Untereinheit.

Modifizierte RNA-Polymerase ist in vitro nicht mehr in der Lage, bestimmte *E. coli*-Gene zu transkribieren.

Die Modifikationsreaktion besitzt eindeutig eine Funktion in der Transcriptionsregulation. Deshalb ist anzunehmen, daß die Alterationsreaktion, die zwar unspezifisch abläuft, aber auch zu ADP-ribosylierter RNA-Polymerase führt, eine ähnliche Rolle spielt, wie die Modifikation.

Man kann sich vorstellen, daß diese nicht-essentiellen T4-Funktionen sich bei der Wirts-mRNA-Synthesehemmung gegenseitig vertreten können und nur bei einer Doppelmutante sichtbar werden.

II. Struktur des ternären Elongationskomplexes

1. Einleitung

Die RNA-Synthese durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase kann in Bindung an die DNA, Initiation, Elongation und Termination der RNA-Kette aufgegliedert werden.

Als Elongation bezeichnet man die durch die Polymerase bewirkte Verlängerung der RNA-Kette.

Die Struktur von Bindungs- und Initiationskomplex und die Mechanismen der Entstehung dieser Komplexe wurden in den letzten Jahren sehr intensiv analysiert, während die Struktur des Elongationskomplexes seit den Arbeiten von Hayashi (76) und Bremer und Konrad (77) nur von wenigen untersucht wurde.

Bislang sind folgende Eigenschaften des Elongationskomplexes bekannt:

1. Die RNA-Polymerase kann während der Elongation selbst durch hohe Ionenstärken nicht mehr von der DNA abdissoziiert werden (78,79,80).
2. Die Polymerase wird im ternären Komplex durch Rifampicin, einem Initiationsinhibitor, nicht mehr inaktiviert (81).
3. Polyanionen wie Heparin (82) und Polyäthansulfonat (83), die freies Enzym sofort inaktivieren, greifen die Polymerase im ternären Komplex nicht an. Die Polyanionen werden offenbar an eine Stelle des Enzyms gebunden, die im ternären Komplex blockiert ist.
4. Die RNA-Polymerase ist im Elongationskomplex besser vor Proteolyse (84,85) und Hitzedenaturierung (86) geschützt als im Bindungskomplex.
5. Bei der Transcription wird ein Zirkulardichroismus-Spektrum beobachtet, das für die A-Form der DNA bzw. für ein DNA-RNA-Hybrid typisch ist (87).
6. Nach wenigen Elongationsschritten wird der σ -Faktor abgegeben. Die Elongation wird vom Minimalenzym katalysiert (88,89).

7. Das 3'OH-Ende der wachsenden RNA-Kette kann im Falle der Transcription superhelikaler DNA-Moleküle als Hybrid mit der DNA isoliert werden (76,90).
8. Für die Elongation sind geringere Substratkonzentrationen erforderlich als für die Initiation (91).

Die Eigenschaften des Elongationskomplexes und andere indirekte Hinweise (92,93) unterstützen die Vorstellung, daß bei der Transcription die beiden DNA-Stränge aufgeschmolzen werden, so daß die Basen des codogenen DNA-Stranges mit den Basen der Ribonucleosidtriphosphate, wie in der DNA-Doppelhelix, Wasserstoffbrücken ausbilden können.

Ein direkter Nachweis des Entstehens von einzelsträngigen Bereichen bzw. des Aufwindens der DNA wurde jedoch bislang nur durch die Arbeiten von Kosagranow et al. (99) bzw. Saucier und Wang (95) erbracht.

Ein Alternativmodell der Transcription, bei dem die DNA-Doppelhelix erhalten bleibt und die Ribonucleosidtriphosphate von einer der DNA-Rillen aus mit den Basen der DNA gepaart werden, wurde von Riley vorgeschlagen (96).

Die Untersuchung der Eigenschaften des isolierten - von Substraten, freier Polymerase und Bindungskomplex abgetrennten - Elongationskomplexes, insbesondere die Analyse der Struktur der DNA in diesem Komplex, war das Thema dieses zweiten Teils der vorliegenden Arbeit.

Die Verwendung von einzelstranspezifischen Nucleasen (97, 98,99,100) hat sich in den letzten Jahren beim Nachweis einzelsträngiger Bereiche in DNA-Molekülen als sehr sinnvoll erwiesen. Diese Endonucleasen sind in der Lage, auch sehr kleine einzelsträngige Bereiche der DNA-Doppelhelix anzugreifen (101). Einzelstrangregionen in superhelikaler DNA (102) in Heteroduplexen und in UV-bestrahlter DNA wurden gespalten (101,103,104).

Es gelang mit Hilfe der einzelstrangspezifischen Nuclease aus *N. crassa* ein Aufschmelzen der DNA, also die Entstehung einzelsträngiger Bereiche während der Transcription, nachzuweisen. Die Länge von DNA und RNA, welche durch die Polymerase im ternären Komplex vor RNase- und DNase-Hydrolyse geschützt ist, wurde bestimmt. Ein Modell des ternären Elongationskomplexes wird diskutiert.

2. Untersuchung von Elongationskomplexen an verschiedenen Matrizen

2.1. Ternärer Elongationskomplex an T7-DNA

2.1.1. Isolierung des ternären Elongationskomplexes an T7-DNA

Der ternäre Transcriptionskomplex wurde durch Zentrifugation in Sucrosegradienten (68,78,77), durch Gelchromatographie mit Biogel P 100 (105) und durch Dichtegradientenzentrifugation mit CsCl bzw. Cs_2SO_4 (106) von den Substraten, und im letzteren Fall auch von Polymerase und Bindungskomplex abgetrennt.

Durch Gelchromatographie mit Sepharose 4B kann eine ausgezeichnete Abtrennung des ternären Komplexes von den Triphosphaten erreicht werden (Abb. 25).

^{32}P -markierte T7-DNA (50 μg) wurde mit Vollenzym (5 μg) und den Substraten (ATP Tritium-markiert) bei mittlerer Ionenstärke für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die RNA-Synthese wurde durch Zugabe von EDTA gestoppt. Der auf 0°C abgekühlte Inkubationsansatz wurde auf eine Sepharose 4B-Säule aufgetragen.

In einem Vorversuch wurde festgestellt, daß bei 0°C in Gegenwart eines EDTA-Überschusses die Anzahl der Enzymmoleküle im Elongationskomplex in einem Zeitraum von 40 Minuten nicht abnimmt.

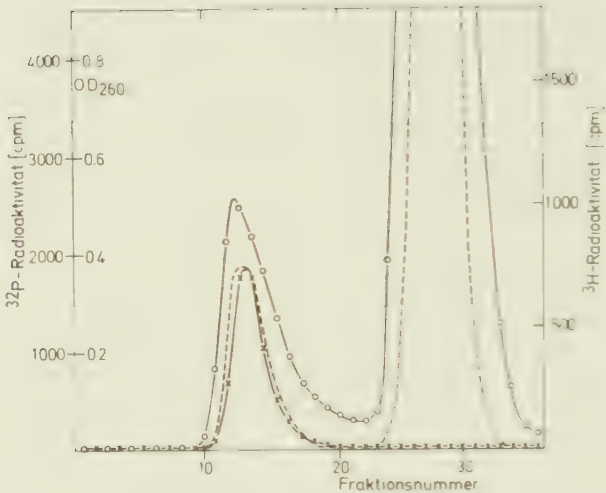


Abb. 25: Gelchromatographische Trennung von ternärem Elongationskomplex und Substraten auf Sepharose 4B-Säulen

Ein RNA-Syntheseansatz mit $50 \mu\text{g}$ ^{32}P -T₇-DNA, $2 \mu\text{g}$ E und den Substraten (^3H -ATP) wurde nach Beendigung der Synthese durch EDTA-Zugabe auf einer Sepharose 4B-Säule ($0,7 \times 15 \text{ cm}$) aufgetrennt. $2 \mu\text{l}$ Aliquots wurden entnommen, in Bray-Scintillator gegeben und gezählt (s. Methoden 1.1.).

x-x DNA o-o RNA --- OD_{260}

Für Untersuchungen der Struktur von DNA und Polymerase im Elongationskomplex muß dieser Komplex von Bindungskomplex und freier Polymerase abgetrennt werden.

Binäre PNA-Polymerase-DNA-Komplexe sind sehr stabil bei niedriger Ionenstärke und 37°C , zerfallen jedoch innerhalb weniger Minuten, wenn die Ionenstärke erhöht, oder die Temperatur erniedrigt wird (43) (75% zerfallen bei 0°C in 3 Minuten). Ternäre Elongationskomplexe sind dagegen auch bei hoher Ionenstärke und niedriger Temperatur stabil (78, 106 und Kap. 2.2.).

Der Vorteil der Verwendung von Sepharose 4B (107) an Stelle von z.B. Biogel P 100 liegt darin, daß Sepharose 4B für Proteine eine Ausschlußgrenze von 2×10^6 besitzt (10^5 für P 100), und daß somit Polymerase im Fraktionierungsbereich der Säule auftritt, während der ternäre Komplex in das Ausschlußvolumen gelangt (Abb. 26).

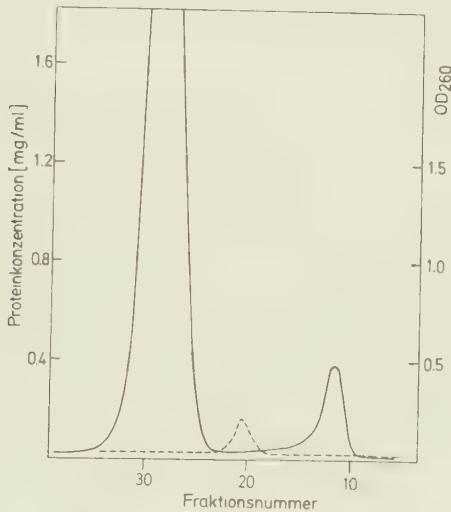


Abb. 26: Gelchromatographische Trennung von Polymerase und T7-DNA auf Sepharose 4B-Säulen

T7-DNA (52 µg) wurde mit Vollenzym (270 µg) bei mittlerer Ionenstärke bei 37°C für 10 Minuten inkubiert und nach EDTA-Zugabe auf einer Sepharose 4B-Säule (0,7x15 cm) getrennt. Als Referenz wurden 20 µl einer Mischung von GTP, CTP, UTP (10 mM) mit aufgetragen. Die Proteinkonzentration wurde nach Heil und Zillig (140) bestimmt.

— OD₂₆₀ ---- Protein

T7-DNA wurde mit Vollenzym bei mittlerer Ionenstärke für 10 Minuten bei 37°C inkubiert, mit einem Überschuß an EDTA versetzt, auf 0°C abgekühlt und, zusammen mit Triphosphaten auf eine Sepharose 4B-Säule aufgetragen. Polymerase und DNA werden voneinander getrennt (Abb. 26).

Unter den Bedingungen, unter denen der ternäre Komplex isoliert wird (Abb. 25), ist somit der Bindungskomplex nicht stabil. Die Präparation von ternärem Komplex enthält keine freie Polymerase, keine Bindungskomplexe und keine Substrate mehr.

Um nachzuweisen, daß die Polymerase des isolierten ternären Elongationskomplexes noch zur RNA-Synthese fähig ist, und daß der ternäre Komplex tatsächlich frei von gebundener Polymerase ist, wurde die Fähigkeit des ternären Transkriptionskomplexes untersucht in Gegenwart (bzw. Abwesenheit) von Rifampicin oder Heparin RNA zu synthetisieren. Rifampicin (81) und Heparin (108) hemmen die Initiation der RNA-Synthese. Wenn noch Bindungskomplexe oder freie Polymerase in der Präparation des ternären Komplexes enthalten ist, erwartet man in Abwesenheit von Rifampicin bzw. Heparin eine höhere RNA-Synthesegeschwindigkeit als in Gegenwart der Inhibitoren (Abb. 27).

Ternärer Elongationskomplex mit T7-DNA und unmarkierten Substraten wurde wie in Abb. 25 beschrieben, isoliert. Aliquote des Ausschlußvolumens der 4B-Säule wurden auf mittlere Salzbedingungen gebracht, mit Substraten versetzt (^{14}C -ATP 5 Ci/M) und bei 37°C inkubiert. Die RNA-Synthese wurde wie üblich verfolgt. Einer der Inkubationsansätze wurde vor Zugabe der Substrate mit 100 µg/ml Rifampicin versetzt. Ein weiterer Ansatz wurde vor Zugabe der Substrate mit 400 µg/ml Heparin versetzt.

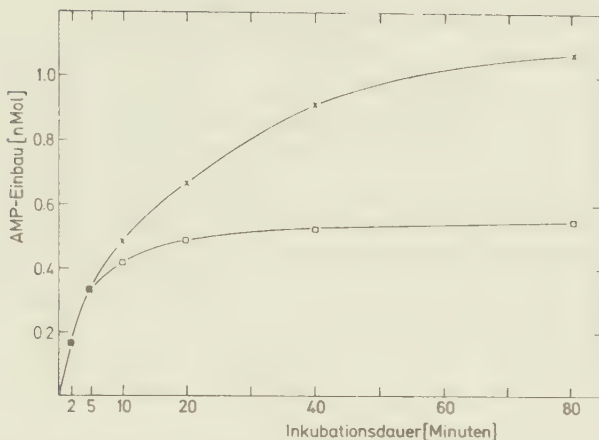


Abb. 27: RNA-Synthesekapazität des isolierten ternären Elongationskomplexes

Ein RNA-Syntheseansatz mit 50 µg T7-RNA und 38 µg Es wurden wie in Abb. 25 beschrieben von Substraten befreit. 500 µl-Aliquote des Ausschlußvolumens der Säule wurden mit 125 µl MixS, 40 µl ^{14}C -ATP (5 Ci/M, 10 mM), 85 µl H_2O und 75 µl Rifampicin (1 mg/ml) versetzt, und bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden 100 µl-Aliquote entnommen, TCA-gefällt und gezählt. Im Falle der Inkubation ohne Rifampicin wurde bei der Fällung 10 µg Rifampicin zugegeben.

x-x ohne Rifampicin □-□ mit Rifampicin

Die RNA-Polymerase im ternären Komplex ist noch aktiv (Abb. 27). Die RNA-Syntheserate in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Rifampicin ist in den ersten Minuten der Inkubation gleich groß. In Gegenwart von Heparin erhält man dieselbe Kinetik. Es ist daher keine freie Polymerase und kein Bindungskomplex in der Präparation enthalten.

Im Rahmen der Meßgenauigkeit konnten keine Verluste an T7-DNA während der Isolierung nachgewiesen werden.

Die Zahl der Polymerasemoleküle im isolierten ternären Elongationskomplex kann nicht exakt angegeben werden. Man kann jedoch aus dem Vergleich der PNA-Menge, welche in 10 Minuten von einer bestimmten Polymerasemenge an T7-DNA synthetisiert wird bzw. vom ternären Komplex mit T7-DNA synthetisiert wird, berechnen, daß etwa 30% der angebotenen Polymerasemoleküle im ternären Komplex vorliegen bzw. noch aktiv sind. Die beiden Syntheseraten sind natürlich nicht direkt vergleichbar - bei der Gesamtreaktion sind die Initiationschritte geschwindigkeitsbestimmend, während bei der hier gemessenen PNA-Synthese nur Elongationsschritte ablaufen.

2.1.2. Stabilität des isolierten ternären Elongationskomplexes

Zur Isolierung des DNase- und RNase-resistenten ternären Elongationskomplexes wurde der ternäre Komplex in Gegenwart der Nucleasen bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der resistent Komplex bei 4°C gelchromatographisch von den niedermolekularen Spaltprodukten abgetrennt (s.u.).

Es mußte zunächst geklärt werden, in welchem Ausmaß die Polymerase unter diesen Bedingungen vom Transkriptionskomplex abdissoziieren kann. Wir bestimmten die RNA-Synthesefähigkeit des Elongationskomplexes in Gegenwart von Rifampicin im Verlaufe einer Inkubation bei 0°C und bei 37°C. Polymerasemoleküle, die während der Inkubation abdissoziieren, werden durch Rifampicin inaktiviert und tragen in der anschließenden Inkubation mit Substraten nicht zur PNA-Synthese bei:

Isolierter ternärer Elongationskomplex wurde in Gegenwart von Rifampicin (140 µg/ml) bei 0°C (Abb. 28) und bei 37°C (Abb. 29) (im letzteren

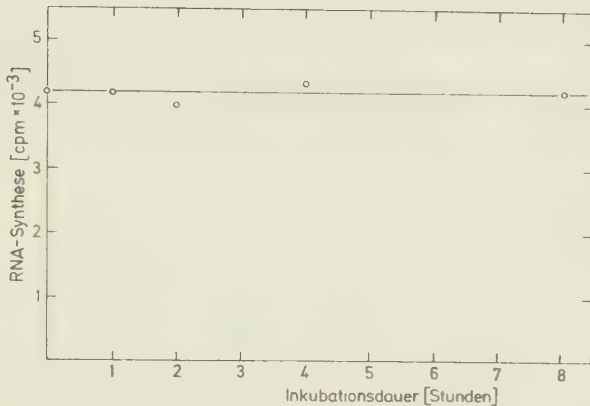


Abb. 28: Stabilität des Elongationskomplexes bei 0°C

Isolierter Elongationskomplex (s. Abb. 27) wurde in Gegenwart von 140 µg/ml Rifampicin bei 0°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Aliquote entnommen, zu einer Substratmischung gegeben, 10 Minuten bei mittlerer Ionenstärke inkubiert und danach wie üblich auf TCA-fällbare RNA analysiert.

Fall in Anwesenheit von CaCl_2 und MgCl_2) inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Aliquote entnommen und unter den üblichen Substrat- und Ionenbedingungen auf RNA-Synthesefähigkeit untersucht.

Die Anzahl der Enzymmoleküle im Elongationskomplex nimmt während der Inkubation bei 0°C (Abb. 28) bzw. 37°C (Abb. 29) nicht signifikant ab, was in Übereinstimmung mit früheren Stabilitätsuntersuchungen steht (78,106,105).

Die Tatsache, daß auch in Gegenwart von MgCl_2 die Anzahl der Polymerasemoleküle im Komplex nicht abnimmt weist darauf hin, daß kein oder nur sehr wenig Substrat in der Komplexpräparation enthalten ist.

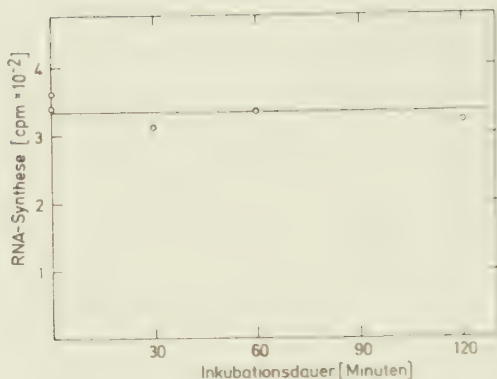


Abb. 29: Stabilität des Elongationskomplexes bei 37°C

Isolierter Elongationskomplex (s. Abb. 27) wurde in Gegenwart von 140 $\mu\text{g/ml}$ Rifampicin und je 0,01 M CaCl_2 und MgCl_2 bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Aliquots entnommen und auf RNA-Synthesefähigkeit untersucht (s. Abb. 26).

2.1.3. Isolierung des DNase- und RNase-resistenten ternären Elongationskomplexes

Die RNA-Polymerase bildet mit Promotorregionen der Transcriptionseinheiten spezifische Bindungskomplexe, welche bei 37°C und niedriger Ionenstärke sehr stabil sind. Sie zerfallen mit einer Halbwertszeit von ca. 50 Stunden (43). Die Polymerase schützt Promotorregionen vor dem Abbau durch DNase.

Durch DNase-Abbau erhält man einen DNase-resistenten Bindungskomplex, der Polymerasemoleküle und ein Stück doppelsträngige DNA der Promotorregion enthält (109,110,111). Dieses DNA-Fragment besitzt eine Länge von etwa 40 Nucleotiden und trägt die Initiationsstelle der RNA-Synthese.

Die Stabilität des Elongationskomplexes erlaubt ebenfalls die Isolierung eines DNase-resistenten Komplexes (112). Durch Abbau mit DNase und RNase wird ein "DNase- und RNase-resistenter Elongationskomplex" erhalten in dem die Polymerase, ein geschütztes Stück DNA und das 3'OH-Ende der wachsenden RNA-Kette enthalten sind (76, 113, 114).

Der ternäre Elongationkomplex wurde wie beschrieben isoliert und in Gegenwart von CaCl_2 und MgCl_2 mit pankreatischer DNase (200 $\mu\text{g/ml}$) und RNase (100 $\mu\text{g/ml}$) 60 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Der Abbau wurde durch EDTA-Zugabe beendet. Der DNase- und RNase-resistente Komplex wurde durch Gelchromatographie mit Sephadex G 100 bei 4°C von den niedermolekularen Abbauprodukten befreit (Abb. 30). Der Komplex erscheint im Ausschlußvolumen der Säule.

Der DNase- und RNase-resistente Komplex kann gelchromatographisch auf einer Sephadex G 100-Säule von den Hydrolyseprodukten abgetrennt werden. Die Menge an erhaltenem Nuclease-resistentem Komplex nimmt mit der ursprünglich eingesetzten Polymerasemenge zu. Wird die Polymerase vor der Hydrolyse durch Phenolisieren aus dem ternären Komplex entfernt, so erhält man keine Radioaktivität im Ausschlußvolumen der Säule.

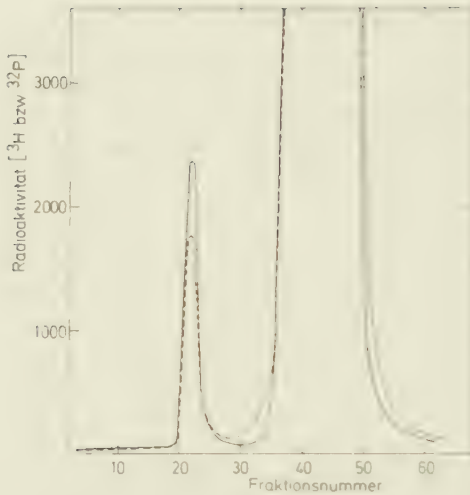


Abb. 30: Gelchromatographische Trennung von DNase- und RNase-resistenter Elongationskomplex und nicht-molekularen Hydrolyseprodukten

Der isolierte ternäre Elongationskomplex wurde mit DNase und RNase inkubiert. Anschließend wurde der Hydrolyseansatz auf eine Sephadex G 100-Säule aufgetragen (s. Methoden l.k.). Aliquote wurden in Brayscintillator gelöst und gezählt.

--- P-32 (DNA) ---- H-3 (RNA)

2.1.4. Bestimmung der Länge von DNA und RNA im DNase- und RNase-resistenten Elongationskomplex

Die Polymerase des wie in Kap. 2.1.3. beschrieben isolierten DNase- und RNase-resistenten Elongationskomplexes wurde durch Phenolisieren entfernt, die DNA und die RNA wurden mit Äthanol gefällt und abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 7 M Harnstoff gelöst, durch Erhitzen auf 100°C denaturiert und auf einem 12%igen Polyacrylamidgel in Gegenwart von 7 M Harnstoff analysiert (Abb. 31).

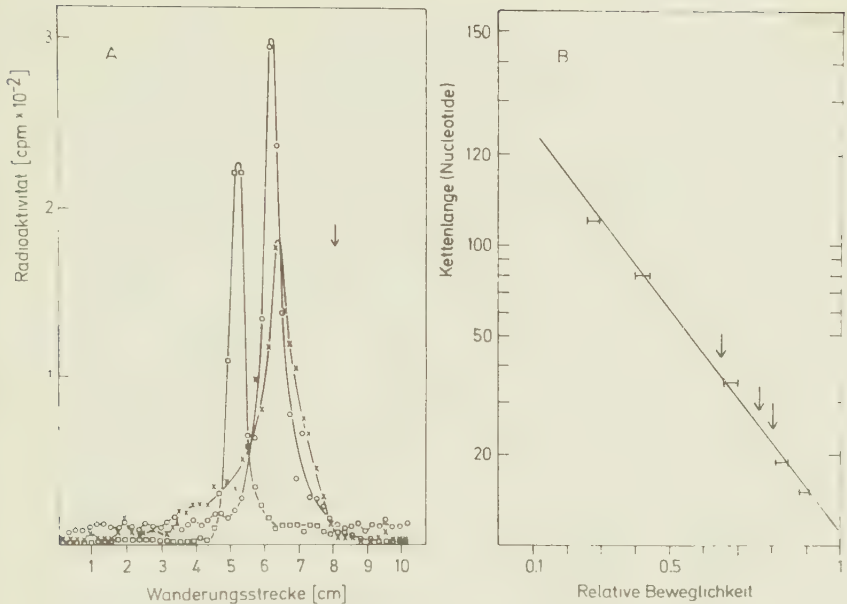


Abb. 31: Bestimmung der Kettenlänge von DNA bzw. RNA im Nuclease-resistenten Elongationskomplex und Bindungskomplex

DNA- und RNA-Ketten wurden denaturiert und in einem Polyacrylamidgel in Gegenwart von 7 M Harnstoff analysiert (s. Methoden 3.c.). Oligonucleotide bekannter Kettenlänge sowie t-RNA und 5S-RNA wurden ebenfalls aufgetragen.

A: DNA des Bindungskomplexes

DNA des Elongationskomplexes

RNA des Elongationskomplexes

Bromphenolblau

B: Die relative Beweglichkeit (im Vergleich zu Bromphenolblau) wurde logarithmisch gegen die Kettenlänge der Oligonucleotide aufgetragen. Die Pfeile markieren (von links nach rechts) die relative Beweglichkeit der DNA des Bindungskomplexes, der DNA des Elongationskomplexes, der RNA des Elongationskomplexes.

Zur Bestimmung der Länge von RNA- und DNA-Ketten wurden außerdem Oligonucleotide mit bekannter Kettenlänge aufgetragen.

Die mittlere Länge der geschützten DNA beträgt 26 ± 3 , der geschützten RNA 22 ± 4 Nucleotide. Die Standardabweichungen gelten für den Mittelwert der Bestimmungen von 6 unabhängigen Präparationen (Abb. 31).

Dieselbe Länge der DNA- und RNA-Ketten wurde erhalten, wenn der ternäre Komplex ohne EDTA-Behandlung isoliert worden war.

Eine Nachreinigung des isolierten ternären Komplexes über eine zweite Sepharose-4B-Säule hatte keine Änderung der Längen von DNA und RNA im Nuclease-resistenten Komplex zur Folge.

Es wurde kein Unterschied zwischen Präparationen beobachtet bei denen 5 Polymerasemoleküle/DNA bzw. 50 Polymerasemoleküle/DNA-Molekül angeboten wurden.

Die Länge der DNA im ternären Elongationskomplex ist mit etwa 26 Nucleotiden kleiner als die Länge der DNA im Bindungskomplex (111).

Es konnte ausgeschlossen werden, daß dies durch eine veränderte Tertiärstruktur der Polymerase auf Grund der EDTA-Behandlung bewirkt wird.

Da bei einer Nachreinigung des isolierten ternären Komplexes über eine zweite 4B-Säule ebenfalls DNA- und RNA-Ketten von 22 bzw. 22 Nucleotiden bestimmt werden, kann man ausschließen, daß durch langsame RNA-Synthese während der Nucleasebehandlung eine kürzere Länge der DNA erhalten wird.

Auffallend ist die Heterogenität der Längen, besonders im Falle der RNA. Die Heterogenität der DNA-Längen tritt beim Bindungskomplex nicht auf (Abb. 31). Da die Sekundärstrukturen der Nucleinsäuren durch Tertiären Harnstoff nicht völlig zerstört werden, und da z.B. partiell doppelsträngige Moleküle (mit "hairpin"-Strukturen) in den Polyacrylamidgelen schneller

wandern als die aufgefalteten Ketten (111) ist bei DNA- und RNA-Ketten, die, wie im Elongationskomplex, keine definierte Sequenz aufweisen, eine breitere Verteilung der Wanderungsstrecken zu erwarten, als bei DNA-Ketten einer definierten Sequenz, wie sie im Bindungskomplex vorliegen.

Außerdem kann pankreatische RNase Purin-Purin- und Purin-Pyrimidin-Bindungen nicht spalten, was ebenfalls zu heterogenen Kettenlängen führt.

RNase destabilisiert die DNA-Doppelhelix (92). Es wäre denkbar, daß die DNA in Gegenwart von RNase von der Polymerase über einen kürzeren Bereich vor DNase-Abbau geschützt ist als in Abwesenheit von RNase. Das wäre eine Erklärung für die geringere Länge der DNA im DNase- und RNase-resistenten Elongationskomplex im Vergleich zur Länge der DNA im DNase-resistenten Bindungskomplex. Aus diesem Grund wurde Bindungskomplex ebenfalls in Gegenwart von RNase mit DNase inkubiert.

³²P-markierte T7-DNA wurde mit Vollenzym bei einem Verhältnis von 5 Polymerasemolekülen pro DNA-Molekül für 15 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend, 1 Stunde lang mit DNase und RNase inkubiert (Abb. 31). Die geschützte DNA-Kette wurde auf einer Sephadex G 100-Säule von den niedermolekularen Hydrolyseprodukten abgetrennt und nach Äthanol-fällung und Denaturierung auf einem 12%-igen Polyacrylamidgel in Gegenwart von 7 M Harnstoff analysiert.

Die Länge der DNA-Kette wurde zu 37 Nucleotiden bestimmt.

Unter den Bedingungen des Abbaus des ternären Komplexes wird durch die im Promotor gebundene RNA-Polymerase ein DNA-Stück mit der Länge von etwa 37 Nucleotiden geschützt. Dieser Wert stimmt mit den in der Literatur angegebenen Längen überein (110,111).

Die Anwesenheit von RNase hat keinen Einfluß auf die Länge der DNA, welche von der Polymerase vor DNase-Verdau geschützt wird.

Im ternären Elongationskomplex werden also weniger Nucleotide vor DNase-Verdau geschützt als im spezifischen Bindungskomplex.

Von Novak (112) wurde die Länge der DNA-Kette, welche von der Polymerase im "Terminationskomplex" vor DNase-Verdau geschützt wird zu 20 Nucleotiden bestimmt. Im Terminationskomplex sind die Polymerasemoleküle vermutlich als Elongationskomplexe vor dem Terminator auf der DNA aufgereiht (68 und Kap. 2.1.5.3).

Kumar und Krakow (113) bestimmten die Länge der RNA, die im ternären Elongationskomplex an Polyd(AT), durch die Polymerase vor RNase-Verdau geschützt ist. Sie erhielten mit mehreren Methoden ein Ergebnis von 12 ± 2 Nucleotiden. Es könnte sein, daß die Polymerase im Elongationskomplex an der synthetischen Matrize Polyd(AT) eine kürzere RNA-Kette bedeckt als an natürlichen Matrizen. Die Ergebnisse mehrerer Versuche dieser Autoren sind jedoch mit der Annahme einer größeren RNA-Kettenlänge vereinbar.

Unsere Längenbestimmungen stützten sich auf die verwendeten Oligonucleotide bekannter Kettenlänge. Da die Eichkurve im Polyacrylamidgel in Gegenwart von 7 M Harnstoff nahezu den erwarteten linearen Verlauf zeigt (109, 110) und die Länge der DNA-Kette im DNase-resistenten Bindungskomplex mit den Bestimmungen anderer Untersuchungen (109, 111) übereinstimmt, nehmen wir an, daß die von uns angegebene mittlere Länge der DNA und RNA im Nuclease-resistenten Elongationskomplex korrekt ist.

Wir nehmen an, daß die RNA-Polymerase durch die Abgabe des σ -Faktors nach den ersten Elongationsschritten in eine veränderte Konformation übergeht in der ein kleinerer Bereich der DNA von der Polymerase bedeckt ist.

Die erhöhte Resistenz der Polymerase im Elongationskomplex gegenüber Proteolyse (84, 85) und Hitzedenaturierung (86) im Vergleich zur Polymerase im Bindungskomplex unterstützt diese Vorstellung.

2.1.5. Bestimmung des Verhältnisses von DNA zu RNA im DNase- und RNase-resistenten ternären Elongationskomplex

Durch Bestimmung der Radioaktivität einer bekannten Menge von ^{32}P -markierter DNA bzw. ^3H -markierten Ribonucleosidtriphosphaten kann angegeben werden, wieviele Nucleotidreste einer bestimmten Anzahl von ^3H - bzw. ^{32}P -Zählimpulsen entsprechen. Somit ist es möglich, aus den Zählimpulsen eines DNase- und RNase-resistenten Elongationskomplexes die Mengen von DNA und RNA zu bestimmen.

Zur Erstellung von Eichkurven wurde die Radioaktivität verschiedener Mengen von ^{32}P -T7-DNA bzw. ^3H -UTP unter Verwendung von sowohl Brayscintillator als auch von Toluolscintillator bestimmt.

Außerdem wurde die Radioaktivität von Aliquoten des DNase- und RNase-resistenten Komplexes (nach Phenolisieren und Äthanol-fällung) ebenfalls unter Verwendung beider Scintillationsflüssigkeiten gemessen.

Das Verhältnis von RNA zu DNA im Nuclease-resistenten ternären Komplex wurde zu 1,3:1 bestimmt ($1,3 \pm 0,4$).

Die Analyse des RNA/DNA-Verhältnisses erwies sich als sehr schwierig. In beiden Scintillationsflüssigkeiten finden langsame Reaktionen statt, die zur Erniedrigung der ^{32}P -Zählausbeute führten.

Das Ergebnis ist der Mittelwert der Bestimmungen von 9 Präparationen und wie aus der Standardabweichung zu entnehmen ist, schwankten die Werte sehr stark. Keiner der Werte lag jedoch unterhalb von 0,8:1.

Es liegt nahe, anzunehmen, daß bei der Hydrolyse des ternären Komplexes durch pankreatische DNase der nicht-codogene DNA-Strang angegriffen wird (s. Kap. 2.3).

Eine andere Erklärung wäre, daß der ternäre Komplex an AT-reichen DNA-Regionen besonders stabil ist, die bei der Isolierung angereichert werden, so daß die RNA des Nuclease-resistenten ternären Komplexes einen hohen AU-Gehalt besitzt. Um ein Verhältnis RNA/DNA von 1/2 zu erhalten, müßte allerdings das Verhältnis von UMP zu den anderen Nucleotiden der geschützten RNA 1/1.5 sein.

Es ist außerdem nicht auszuschließen, daß der nicht-codogene DNA-Strang im Elongationskomplex durch den destabilisierenden Einfluß der RNase für die DNase zugänglich wird.

2.1.6. Nachweis von einzelsträngigen Bereichen in der DNA des ternären Elongationskomplexes

2.1.6.1. Einleitung

Es wird allgemein angenommen, daß während der DNA-abhängigen Synthese einer RNA-Kette durch die RNA-Polymerase die DNA-Doppelhelix über einen gewissen Bereich aufgeschmolzen, denaturiert wird (115).

Nach einem anderen Modell (96) bleibt jedoch die Doppelhelixstruktur der DNA erhalten, und die Basen der Ribonucleotide werden "von außen" mit den Basen des codogenen DNA-Stranges gepaart. Mit abnehmender Länge der aufgewundenen DNA-Region gehen die Vorstellungen ineinander über.

Viele charakteristische Eigenschaften der Transcriptionsreaktion können durch das erste Modell besser erklärt werden als durch das zweite (92,93).

Walter et al. (108) entwickelten 1967 die Vorstellung, daß die DNA durch die gebundene RNA-Polymerase aufgewunden werden kann - also in Abwesenheit von RNA-Synthese - und in der Folgezeit wurde diese Arbeitshypothese durch andere Arbeiten unterstützt (116,95,117). Chamberlin (115) nennt den spezifischen Bindungskomplex bei dem die DNA aufgewunden sein soll, den "offenen Komplex".

Von Beabealashvily (87) wurde gezeigt, daß während der Transcription von kurzen doppelsträngigen DNA-Ketten ein Zirkulardichroismus-Signal auftritt, welches für die A-Form der DNA, aber auch für eine hybride Strecke typisch ist. Kosaganov et al. (94) wiesen nach, daß durch die Transcription "Störungen" in der Doppelhelix-Struktur auftreten, und Saucier und Wang (95) zeigten, daß die DNA-Doppelhelix schon durch die spezifische Bindung der Polymerase an die DNA aufgewunden wird.

Einzelsträngige Bereiche in einer DNA-Doppelhelix können von einzelstrangspezifischen Nucleasen angegriffen werden. Einzelstrangregionen in UV-bestrahlter DNA (103,104), in superhelikaler DNA (102) und in Heteroduplexen (101) wurden mit diesen Enzymen nachgewiesen. Die Nucleasen aus *Neurospora crassa* besitzen gegenüber der S_1 -Nuclease aus *Aspergillus niger* (99) den Vorteil, daß sie bei neutralem pH aktiv sind. Somit ist es möglich, die Struktur der DNA im ternären Elongationskomplex mit einer einzelstrangspezifischen Endonuclease aus *Neurospora crassa* zu analysieren.

2.1.6.2. Bedingungen des Verdau von ternärer Elongationskomplex mit einzelstrangspezifischer Endonuclease

Die verwendete Endonucleasepräparation enthält neben der Aktivität, welche spezifisch denaturierte DNA und RNA spaltet eine zweite Aktivität, welche doppelsträngige DNA angreift. Nach Linn und Lehman (98) kann bei genügend kleinen Konzentrationen der eingesetzten Nuclease und in Gegenwart von Mercaptoäthanol bei pH 8 der Verdau von doppelsträngiger DNA stark vermindert werden.

Native bzw. hitzedenaturierte T7-DNA (5 µg) wurde mit 1 bzw. 0,01 Enzymeinheiten pro ml der Endonuclease aus *N. crassa* bei pH 7,9 inkubiert (Abb. 32). Zu verschiedenen Zeiten wurden Aliquote entnommen, TCA-gefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert. Die Radioaktivität im Überstand wurde bestimmt.

Durch hohe Endonucleasekonzentrationen wird die denaturierte DNA in 20 Minuten vollständig zu säurelöslichen Nucleotiden abgebaut. Native DNA wird ebenfalls in erheblichem Maße angegriffen (Abb. 32). Bei reduzierter Endonucleasekonzentration wird die denaturierte DNA langsamer gespalten und aus nativer DNA werden selbst nach langen Inkubationszeiten nahezu keine säurelöslichen Nucleotide freigesetzt.

Der biphasische Verlauf der Kinetik der Hydrolyse einzelsträngiger DNA entsteht dadurch, daß kleinere Oligonucleotide sehr viel langsamer gespalten werden als lange DNA-Ketten (98).

Wie schon von Rabin et al. (118) beobachtet, wird die Endonuclease durch Erhöhung der Salzkonzentration gehemmt und nicht, wie von Linn und Lehman berichtet wurde, stimuliert.

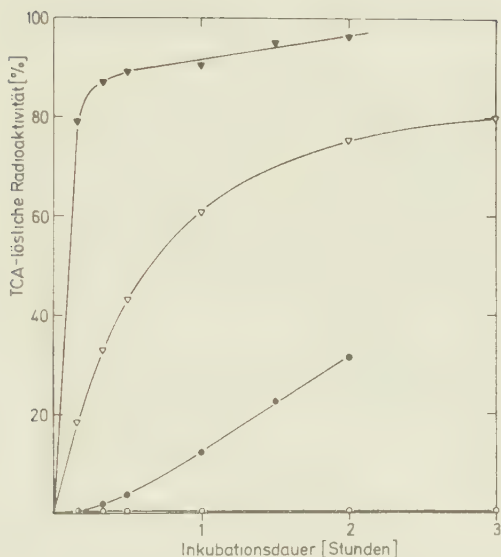


Abb. 32: Einfluß der Konzentration der Nuclease aus *N. crassa* auf den Abbau nativer und denaturierter DNA

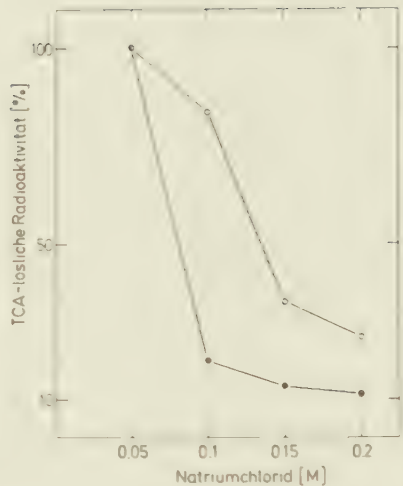
Native bzw. hitzedenaturierte ^3H -T7-DNA (9 $\mu\text{g/ml}$) wurde mit 1 U/ml bzw. 0,01 U/ml der Endonuclease aus *N. crassa* unter Standardbedingungen inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurde die Menge der ausgebauten Nucleotide bestimmt (s. Methoden 2.c). 1 U/ml Nuclease mit denaturierter DNA ▼-▼, nativer DNA ●-●, 0,01 U/ml Nuclease mit denaturierter DNA ▽-▽, nativer DNA ○-○

Wir entdeckten eine unterschiedliche Ionenstärkeabhängigkeit der Nucleaseaktivität an nativer bzw. denaturierter DNA (Abb. 33).

Die Nucleaseaktivität an nativer DNA wird durch 0,1 M NaCl auf 20% der Aktivität bei 0,05 M NaCl gehemmt, während die Nucleaseaktivität an denaturierter DNA durch 0,1 M NaCl auf 85% der Aktivität bei 0,05 M NaCl gehemmt wird.

Abb. 33: Einfluß der Ionenstärke auf den Abbau nativer und denaturierter DNA

Native bzw. hitzedenaturierte ^3H -T7-DNA (9 $\mu\text{g/ml}$) wurde mit 0,01 U/ml bei verschiedenen Konzentrationen von NaCl (sonst Standardbedingungen) für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und auf säurelösliche Nucleotide untersucht. Die bei 0,05 M NaCl erhaltene Menge von ausgebauten säurelöslichen Nucleotiden wurde als 100% gesetzt. Denaturierte DNA ○—○
Native DNA ●—●



Wir wählten folgende Standardbedingungen für den Verdau: 0,1 M NaCl 0,015 M Tris-Cl pH 7,9, 0,005 M MgCl_2 , 0,003 M Mercaptoäthanol und 0,005 Enzymeinheiten/ml der Endonucleasepräparation. Unter diesen Bedingungen wurden in 2 Stunden 50% der denaturierten DNA, jedoch nur 0,1% der nativen DNA zu säurelöslichen Nucleotiden verdaut.

Die einzelstrangspezifische Endonuclease aus *N. crassa* wird im Gegensatz zu der ebenfalls einzelstrangspezifischen Exonuclease aus *N. crassa* durch ATP gehemmt (118,119).

Wir beobachteten eine Hemmung der Aktivität auf etwa 20% bei einer Konzentration der 4 Triphosphate von je 0,5 mM. Beim Nachweis einzelsträngiger Bereiche in der DNA des ternären Elongationskomplexes sollten somit keine Ribonucleosidtriphosphate anwesend sein.

2.1.6.3. Abhängigkeit des Anteils einzelsträngiger DNA von der Anzahl ternärer Komplexe pro DNA-Molekül

Bei der Transcription von T7-DNA unter Bedingungen niedriger Ionenstärke bleibt die RNA-Polymerase nach Überschreitung der ersten 20% der T7-DNA an der Terminatorregion der DNA gebunden und kann nicht wieder neu initiieren. Nach einem von Schäfer et al. (68) vorgeschlagenen Modell kann das erste Polymerasemolekül, welches den Terminator erreicht, seine RNA-Kette abgeben, nicht jedoch jedes weitere Polymerasemolekül, welches auf dieses, im Terminator gebundene erste Molekül "aufläuft" und nicht mehr in die Terminatorregion der DNA eintritt.

Bei niedriger Ionenstärke und hohem RNA-Polymerase: DNA-Verhältnis sollten somit bei genügend großen Inkubationszeiten fast alle aktiven RNA-Polymerasemoleküle im ternären Elongationskomplex vorliegen.

³H-T7-DNA wurde mit verschiedenen Mengen von RNA-Polymerase bei niedriger Ionenstärke und mit unmarkierten Ribonucleosidtriphosphaten 1 Stunde bei 37°C inkubiert, auf 0°C abgekühlt und auf Sepharose-4B-Säulen aufgetragen. Die den ternären Komplex enthaltenden Fraktionen des Ausschlußvolumens wurden vereinigt und mit Nuclease unter den Standardbedingungen inkubiert. Gleiche Mengen radioaktiver DNA wurden der Nucleasebehandlung unterzogen. Nach 0,1,2 und 3 Stunden wurden Aliquote entnommen und mit TCA gefällt. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert. Die Radioaktivität des Überstandes wurde unter Verwendung von Brayscintillator bestimmt (Abb. 34).

Als Kontrolle wurden ein Ansatz ohne RNA-Polymerase und ein weiterer Ansatz ohne Nucleotide genau gleich behandelt.

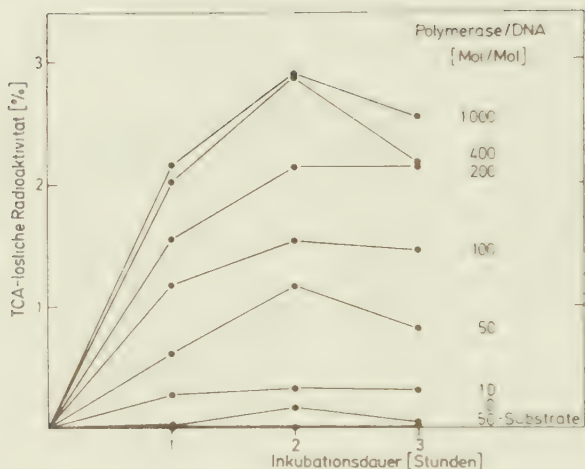


Abb. 34: Nuclease-sensitive DNA-Bereiche in ternären Elongationskomplexen (niedrige Ionenstärke)

Standard-RNA-Syntheseansatz mit ^3H -T7-DNA (1,2 μg , 100000 cpm) und verschiedenen Mengen RNA-Polymerase wurden bei niedriger Ionenstärke für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und danach von den Substraten befreit (s. Methoden l.i.v.). Gleiche DNA-Mengen der verschiedenen Präparationen ternärer Komplexe wurden dem Abbau durch 0,005 U/ml der Endonuclease unter Standardbedingungen unterworfen. Die Menge der ausgebauten Nucleotide wird in Prozent der in den Abbau eingesetzten DNA-Menge angegeben.

In einem weiteren Kontrollversuch wurde die DNA mit RNA-Polymerase inkubiert und die säurelöslichen Nucleotide wurden im Überstand der TCA-Fällung bestimmt.

Bei mehreren Polymerase/DNA-Verhältnissen wurde die RNA-Synthese anstatt bei niedriger Ionenstärke bei mittlerer Ionenstärke durchgeführt. In diesen Fällen wurde der Reaktionsansatz nach 10 Minuten auf 0°C abgekühlt, auf die Sepharosesäule aufgetragen und wie üblich weiter behandelt (Abb. 35).

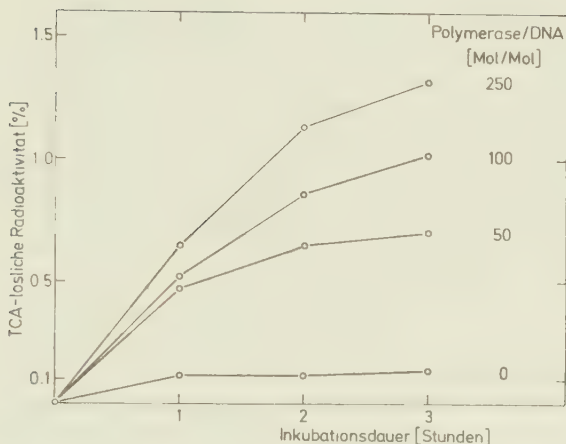


Abb. 35: Nuclease-sensitive DNA-Bereiche in ternären Elongationskomplexen (mittlere Ionenstärke)

Standard-RNA-Syntheseansätze mit $^3\text{H-T7-DNA}$ (1,2 μg) und den angegebenen Mengen RNA-Polymerase wurden bei mittlerer Ionenstärke für 10 Minuten bei 37°C inkubiert und dann wie in Abb. 34 behandelt.

In Abhängigkeit von der Anzahl der pro DNA-Molekül angebotenen RNA-Polymerasemoleküle treten immer mehr Bereiche in der DNA des ternären Komplexes auf, die von der einzelstrangspezifischen Nuclease zu säurelöslichen Nucleotiden verdaut werden können (Abb. 34). Keinen erhöhten Ausbau beobachtet man in Abwesenheit von RNA-Polymerase oder in Abwesenheit der Endonuclease. Die RNA-Polymerasepräparation enthält mithin keine DNase-Aktivität.

Wenn die DNA mit RNA-Polymerase in Abwesenheit von Nucleotiden unter den üblichen Bedingungen inkubiert und, nach 4B-Gelchromatographie, mit der

Endonuclease verdaut wurde, war ebenfalls kein erhöhter Ausbau festzustellen: Es ist folglich auszuschließen, daß die Polymerasepräparation das Entstehen einzelsträngiger Bereiche verursacht, welche dann von der Nuclease angegriffen werden können.

Unter der Annahme, daß durch die Nuclease pro Polymerasemolekül etwa 20 Nucleotide abgebaut werden, kann man berechnen, daß signifikante Mengen säurelöslicher Nucleotide erst ab 10 Polymerasemoleküle pro DNA-Molekül zu erwarten sind.

In der DNA des ternären Elongationskomplexes treten Nuclease-sensitive Bereiche auch dann auf, wenn die RNA-Synthese bei mittlerer Ionenstärke durchgeführt wird. Bei mittlerer Ionenstärke kann die RNA-Polymerase die DNA am Terminator verlassen und anschließend neu initiieren. Im Gegensatz zur Aufreihung der Polymerasemoleküle vor dem Terminator bei niedriger Ionenstärke sind bei mittlerer Ionenstärke die Polymerasemoleküle zu einem bestimmten Zeitpunkt statistisch über die Transcriptionseinheit verteilt.

Das Vorhandensein Nuclease-sensitiver DNA-Bereiche ist demnach eine Eigenschaft des ternären Elongationskomplexes und nicht eine Besonderheit des ternären "Terminationskomplexes".

Wang (90) versuchte mit einzelstrangspezifischer Endonuclease aus *N. crassa* das Auftreten von denaturierten Bereichen während der Transcription von PM 2 DNA nachzuweisen. Das negative Resultat ist wahrscheinlich durch die Anwesenheit der Ribonucleosidtriphosphate während des Verdaus und die dadurch bedingte Hemmung der Nuclease zu erklären.

Welche Struktur muß die DNA besitzen, damit sie durch die einzelstrangspezifische Endonuclease angegriffen werden kann?

Die Endonuclease aus *N. crassa* verdaut die einzelsträngigen Bereiche der t-RNA^{Phe} (120), eine Mischung der Endo- und Exonucleasen aus *N. crassa* baut die großen einzelsträngigen Bereiche in Heteroduplexen ab. Die denaturierten Regionen von einer Länge von 10-20 Nucleotiden, die durch Thymin-Dimerisierung nach UV-Bestrahlung von DNA auftreten (121), sind Angriffspunkte der Nuclease (103,104).

Einzelstrangbereiche in superhelikalen DNA-Molekülen, wie z.B. beim RF I des Phagen ϕ X 174 (102) und der DNA des Phagen PM 2 (90) werden von den Enzymen erkannt. Es wurde gezeigt, daß die Angreifbarkeit der DNA mit Erhöhung des negativen Überdrillens (overtwist) der DNA zunimmt (90) und daß dies wahrscheinlich durch kleine Regionen einzelsträngiger DNA verursacht wird (122), die für pankreatische DNase keinen bevorzugten Angriffspunkt darstellen (90). Man stellt sich vor, daß in den DNA-Molekülen mit Superhelix-Struktur ab einer bestimmten Anzahl von negativen "Superhelix-Windungen" (superhelical density $>-0,035$) enge Biegungen auftreten (sog. "kinks", "elbows", "bends") und daß an diesen Stellen die DNA-Doppelhelix entweder auf der Länge einiger Basenpaare aufgewunden wird, oder daß es zu Störungen der DNA-Struktur über einen größeren Bereich kommt.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Endonuclease aus *N. crassa* ungepaarte Regionen in DNA-Doppelhelices angreift. Über die minimale Länge des Bereichs mit gestörter DNA-Struktur ist aus den vorliegenden Daten keine exakte Aussage möglich, sie scheint jedoch im Bereich einiger Basenpaare zu liegen.

Welche Aussagen über die Struktur der DNA im ternären Komplex können aus dem Ergebnis unserer Versuche - unter Berücksichtigung der Spezifität der Endonuclease - abgeleitet werden?

1. Die Struktur der DNA ist im ternären Komplex so verändert, daß sie durch die Endonuclease angegriffen wird. Ein Modell der Transcription, bei dem die DNA-Doppelhelix erhalten bleibt, und die Basen der Substrate "von außen" mit den Basen des codogenen DNA-Stranges gepaart werden (A) ist mit diesem Ergebnis nur sehr schwer zu vereinbaren (Abb. 36).
2. Die DNA im ternären Elongationskomplex ist der Endonuclease zugänglich. Das 3'OH-Ende der wachsenden RNA-Kette wird vor RNase-Verdau geschützt und die DNA (bzw. ein Teil der DNA, s. Kap. 2.1.5.) kann von DNase nicht angegriffen werden. Zwei Modelle sind denkbar: Entweder wird die DNA-Struktur über eine Länge gestört, welche größer ist als der Bereich, der von der Polymerase bedeckt ist und kann so neben dem Polymerasemolekül angegriffen werden (B) oder ein bestimmter Bereich der DNA - vermutlich der nicht-codogene Strand - wird im Bereich der Polymerase exponiert und kann angegriffen werden (C).

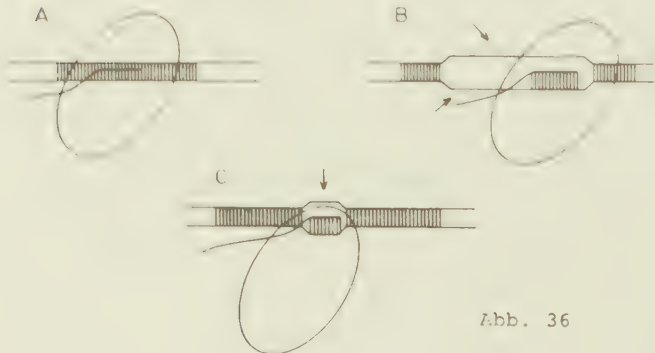


Abb. 36

Von Bick et al. (123) wurde beobachtet, daß der DNA-Bereich hinter der Polymerase destabilisiert ist. Diese Bereiche wurden jedoch nur in Gegenwart von Formamid entdeckt. Da die denaturierten DNA-Bereiche in Gegenwart von 60% Formamid größer sind als in Gegenwart von 40% Formamid, bleibt unklar, auf welche Länge die DNA durch die Polymerase in Abwesenheit von Formamid aufgewunden wird.

3. Es werden säurelösliche Nucleotide ausgebaut. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Fraser et al. (102, 103) bei denen das Auftreten von Einzelstrangbrüchen ("nicks") in DNA-Molekülen mit einzelsträngigen Regionen verfolgt wurde, bestimmten wir das Auftreten von säurelöslichen Nucleotiden.

Leider konnte nicht bestimmt werden, wieviel Enzymmoleküle pro DNA-Molekül in den Präparationen des ternären Komplexes enthalten waren. Mit der Annahme, daß etwa 50% der angebotenen RNA-Polymerasemoleküle als ternärer Komplex isoliert wurde, kann man aus der Menge der säurelöslichen Nucleotide einen Ausbau von 10-30 Nucleotiden pro Polymerasemolekül berechnen. Es wurde beobachtet, daß bei steigendem Nuclease/DNA-Verhältnis mehr Nucleotide ausgebaut werden. Das weist darauf hin, daß die Nuclease fähig ist, in kooperativer Weise die DNA aufzuwinden (102,104). Die Zahl der ungepaarten Nucleotide pro RNA-Polymerasemolekül ist deshalb möglicherweise kleiner als die berechneten 10-30 Nucleotide. Der Verlauf der Hydrolysekinetik spricht allerdings gegen das Vorhandensein kooperativer Effekte unter den gewählten Bedingungen.

Von Saucier und Wang (95) wurde angegeben, daß bei der Bindung der Polymerase die DNA-Doppelhelix pro Polymerasemolekül auf eine Länge von 4-8 Basenpaaren aufgewunden wird. Diese Angabe erhöht sich durch die Neubestimmung einer Konstanten, die in die Berechnung der Länge des denaturierten Bereichs eingeht (124), auf den doppelten Wert, also 8-16 Nucleotide.

2.1.6.4. Versuch des Nachweises einzelsträngiger Bereiche in der DNA des Bindungskomplexes

Nach dem Modell von Walter et al. (108) und Chamberlin (115) ist im Bindungskomplex, dem "offenen Komplex", die DNA aufgewunden. Von Saucier und Wang (95) wurde diese Annahme experimentell bestätigt.

Wir analysierten die Struktur der DNA im Bindungskomplex mit Hilfe der einzelstrangspezifischen Nuclease aus *N. crassa*.

Wir inkubierten T7-DNA und RNA-Polymerase in demselben Verhältnis wie in den vorausgegangenen Versuchsreihen (10-400 Polymerasemoleküle/DNA-Molekül) für 20 Minuten bei 37°C unter den Salzbedingungen des Nucleaseverdaus (0,1 M NaCl, 0,015 M Tris-Cl, pH 7,9, 0,005 M MgCl₂). Anschließend wurde Endonuclease zugegeben (0,05 Enzymeinheiten/ml). Nach 0,1, 2 und 3 Stunden wurde der Ansatz auf ausgebaute säurelösliche Nucleotide untersucht. Es war kein Ausbau festzustellen.

In der DNA des Bindungskomplexes waren keine Nuclease-sensitiven Bereiche nachzuweisen. Nach Hinkle et al. (43) und Mangel und Chamberlin (125) sollten sich un-

ter den angegebenen Bedingungen stabile Bindungskomplexe ("offene Komplexe") an den 4 Promotoren (107) der T7-DNA bilden. 4 durch Polymerasemoleküle aufgewundene Strecken pro DNA-Molekül liegen unterhalb der Empfindlichkeitsgrenze unserer Methode.

Unter diesen Bedingungen werden neben den spezifischen Bindungskomplexen an den Promotoren unspezifische Bindungskomplexe an der gesamten T7-DNA gebildet.

Dieser Versuch zeigt, daß die unspezifisch, nicht am Promotor gebundenen Polymerasemoleküle nicht fähig sind, die DNA aufzuwinden. Ob die Struktur der DNA im spezifischen Bindungskomplex identisch ist mit der Struktur der DNA im ternären Elongationskomplex und deshalb ebenfalls von der Endonuclease angegriffen wird, oder ob bei der Elongation tiefer greifende Veränderungen der DNA-Doppelhelix als bei der Bindung auftreten (94) kann mit Hilfe unserer Methode nicht entschieden werden.

2.2. Ternärer Elongationskomplex an Poly(dA) (dT)

2.2.1. Einleitung

Wie im letzten Kapitel gezeigt wurde, sind 2 Modelle der Struktur der DNA im ternären Komplex mit unseren Ergebnissen vereinbar.

1. Die DNA wird über einen größeren Bereich denaturiert. Die ausgebauten säurelöslichen Nucleotide stammen aus beiden DNA-Strängen (Modell B in Abb. 36).
2. Der nicht-codogene Strang der DNA ist der Nuclease zugänglich (Modell C in Abb. 36).

Mit einer Methode, welche erlaubt, die ausgebauten Nucleotide einem der beiden DNA-Stränge zuzuordnen, kann zwischen den beiden Hypothesen entschieden werden.

Poly(dA)(dT) ist ein DNA-Molekül, welches in einem Strang nur Adenin als Base, im anderen Strang nur Thymin enthält. In Gegenwart von ATP bzw. UTP wird nur der A-Strang bzw. der T-Strang von der RNA-Polymerase transkribiert.

Trifft Modell C des Elongationskomplexes zu, sollten durch die Nuclease aus *N. crassa* nur (dA)_n Oligonucleotide ausgebaut werden, wenn mit ATP als Substrat transkribiert wurde bzw. nur (dT)_n Oligonucleotide, wenn mit UTP transkribiert wurde. Wenn Modell B zutrifft, sollten in beiden Fällen (dA)_n und (dT)_n Oligonucleotide ausgebaut werden.

2.2.2. Isolierung des Elongationskomplexes an Poly(dA)(dT) und Nachweis einzelsträngiger Bereiche in der DNA des Komplexes

³H-markiertes Poly(dA)(dT) wurde mit RNA-Polymerase in Gegenwart von ATP bzw. UTP bei niedriger Ionenstärke für 10 Minuten bei 37°C unter RNA-Synthesebedingungen inkubiert und danach auf 0°C abgekühlt. Überschüssiges Substrat wurde auf einer Sephadex G 75-Säule abgetrennt. Der Säulenpuffer entsprach dem üblichen Hydrolysepuffer, enthielt jedoch zur Verhinderung unspezifischer Adsorption zusätzlich 0,01% Brij. Die Fraktionen des Ausschlussvolumens wurden vereinigt und gleiche Mengen der DNA des ternären Komplexes wurden der Hydrolyse durch *N. crassa*-Nuclease unter den üblichen Bedingungen (0,05 U/min) unterworfen. Die Radioaktivität der ausgebauten säurelöslichen Nucleotide wurde wie üblich bestimmt (Abb. 37). Als Kontrolle wurden Ansätze ohne Polymerase und ohne Substrat derselben Behandlung unterzogen. Die DNA des

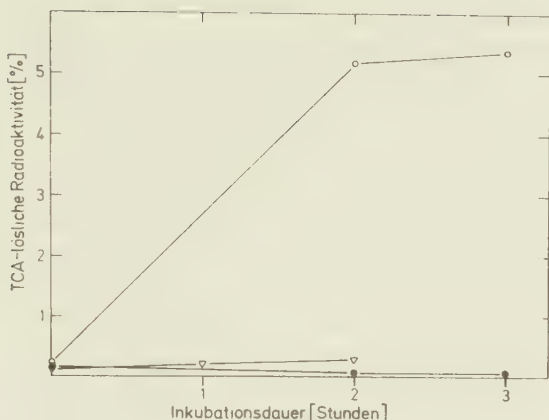


Abb. 37: Nachweis Nuclease-sensitiver Bereiche im Elongationskomplex an Poly(dA) (dT)

Isolierter Elongationskomplex mit Poly(rU) bzw. Poly(rA) als RNA-Kette (s. Methoden l.j.α.) wurde unter Standardbedingungen mit Endonuclease inkubiert.

Elongationskomplex mit Poly(rA) o—o mit Poly(rU) ▽—▽

Komplexpräparation in Abwesenheit von Substraten oder in Abwesenheit von Polymerase -●-●-

ternären Komplexes an Poly(dA) (dT) enthält Nuclease-sensitiver Bereiche. Die Präparation des ternären Komplexes enthält natürlich in diesem Fall Bindungskomplexe und freie Polymerasemoleküle die aber, wie die Kontrolle zeigt, keinen Ausbau verursachen.

Die Präparation von Poly(dA) (dT) ist weitgehend frei von einzelsträngigen Bereichen (Abb. 37). Während der Transcription entstehen Einzelstrangregionen, die von der Endonuclease angegriffen werden.

Bei der Transcription mit ATP als Substrat werden weitaus mehr denaturierte Bereiche gebildet als bei Transcription mit UTP. Das kann durch eine unterschiedliche Anzahl von transcribierenden Polymerasemolekülen erklärt werden: Bei

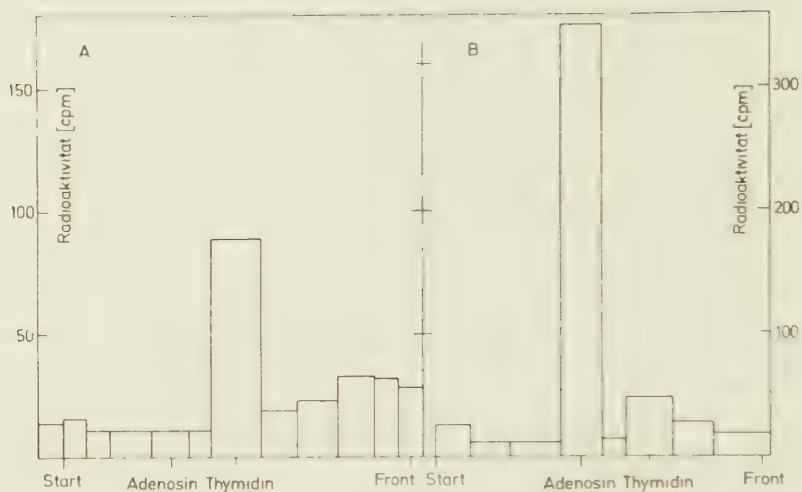


Abb. 38: Dünnschichtchromatographische Identifizierung der aus Elongationskomplexen an Poly(dA) (dT) freigesetzten Nucleotide

Die von der Endonuclease ausgebauten Oligonucleotide wurden durch Phosphodiesterase und alkalische Phosphate zu Nucleosiden gespalten und auf Cellulosedünnschichtplatten aufgetragen. Laufmittel H_2O (s. Methoden 3.d.). Bei der Phosphatase-Inkubation wurde das zugesetzte dAMP und dTMP zu den Nucleosiden gespalten, die als optische Referenz dienten. Die Cellulose wurde abgekratzt, in Toluolszintillator gegeben und gezählt.

A: Ternärer Komplex mit Poly(rU)

B: Ternärer Komplex mit Poly(rA)

DNA-Molekülen, die alle Pyrimidine in einem und alle Purine im anderen DNA-Strang enthalten, wird der Purinstrang in sehr viel geringerem Ausmaß transkribiert (126), vermutlich weil die Initiation der Transcription mit Pyrimidintriphosphaten "unnatürlich" ist und sehr viel langsamer abläuft (127).

2.2.3. Identifizierung der beim endonucleolytischen Verdau der DNA des ternären Komplexes freigesetzten Nucleotide

Mehrere Syntheseansätze mit je 100 000 cpm ^3H -Poly(dA)(dT) (5 μg), RNA-Polymerase (40 μg) und entweder UTP oder ATP als Substrat wurden über eine Sephadex G 75-Säule von Substrat befreit, 3,5 Stunden mit 0,05 U/ml Nuclease inkubiert und dann TCA gefällt. Nach Zentrifugation des Niederschlags wurde der Überstand, welcher die herausgespaltenen Nucleotide enthält, durch DEAE-Säulenchromatographie (s. Material und Methoden) von Salzen befreit. Die ausgebauten Oligonucleotide wurden mit Schlangengiftphosphodiesterase und alkalischer Phosphatase zu den Nucleosiden verdaut und anschließend dünnsschichtchromatographisch analysiert (Abb. 38).

Bei der Nuclease-Behandlung des ternären Komplexes Polymerase/Poly(dA)(dT)/Poly(rA) wird vorwiegend Oligo(dA) ausgebaut, beim Verdau des ternären Elongationskomplexes Polymerase/Poly(dA)(dT)/Poly(rU) vorwiegend Oligo(dT)

Bei der Transcription von Poly(dA)(dT) wird der nicht-codogene Strang destabilisiert, so daß er von der einzelstrangspezifischen Nuclease gespalten werden kann. Die Vorstellung, daß die DNA-Doppelhelix während der Transcription über einen größeren Bereich denaturiert ist, und daß die Nuclease deshalb beide DNA-Stränge angreifen kann (Modell B in Abb. 37) ist jedenfalls für Poly(dA)(dT) auszuschließen.

Die Nuclease-sensitiven Bereiche werden nicht durch das Entstehen tripelsträngiger DNA-RNA-Moleküle verursacht: dAdTrA ist bislang nicht beobachtet worden und dAdTrU zerfällt bei 37°C zu dAdT und rU (128).

Poly(dA)(dT) liegt wie die natürlichen DNAs in einer B-Form der Doppelhelix vor (129,130), kann jedoch bei geringer Feuchtigkeit nicht - wie die natürlichen Ma-



Abb. 39: Identifizierung der Nucleotide im Nuclease-resistenten Elongationskomplex an Poly(dA)(dT)

Isolierter ternärer Komplex (s. Methoden 3.e.) wurde mit DNase und RNase inkubiert. Die DNA des DNase- und RNase-resistenten Komplexes wurde mit Phosphodiesterase und alkalischer Phosphatase zu den Nucleosiden gespalten und auf Cellulosedünnschichtplatten aufgetragen (s. Abb. 37).
A: Ternärer Komplex mit Poly(rU)
B: Poly(dA)(dT) hydrolysiert mit DNase, Phosphodiesterase und alkalischer Phosphatase
C: Ternärer Komplex mit Poly(rA)

trizen - aus dieser B-Form in die A-Form übergehen. Die A-Form ist auch bei Poly d(AT) labil (129,131) und geht leicht in eine spezielle B-Form über (130).

Natürliche DNA liegt in Lösung in der B-Struktur vor. Von Florentiev und Ivanov (132) wurde vorgeschlagen, daß bei der Transcription durch die RNA-Polymerase ein gewisser Bereich der DNA von der B-Form in die A-Struktur umgewandelt wird, um das Aufwinden der DNA und die Basenpaarung zu erleichtern.

Von Beabealashvily (87) wurde beobachtet, daß bei der Transcription der kurzen DNA-Kette, welche im Bindungskomplex vor DNase geschützt ist, ein CD-Signal auftritt, das für die A-Struktur der DNA typisch ist. Er konnte allerdings nicht entscheiden, ob dies tatsächlich durch einen Übergang der DNA von der B-Form in die A-Form, oder durch das Entstehen eines DNA-RNA-Hybrids hervorgerufen wird.

Es ist also denkbar, daß die Transcription von Poly(dA)(dT) nach anderen Mechanismen abläuft, unter Ausbildung einer anderen DNA-Struktur im ternären Komplex, als die Transcription von natürlichen Matrizen, welche sowohl in der B-Form, als auch in der A-Form vorliegen können.

Man kann sich jedoch vorstellen, daß eine lokale A-Struktur auch in diesem Fall durch die Polymerase oder - wie von Arnott (130) vorgeschlagen - durch das 3'OH-Ende der RNA-Kette stabilisiert wurde. Es ist anzunehmen, daß die prinzipiellen Eigenschaften eines ternären Komplexes an Poly(dA)(dT) und an T7-DNA sich nicht grundlegend unterscheiden, daß also die Nuclease-sensitiven Bereiche des ternären Komplexes an T7-DNA ebenfalls im nicht-codogenen DNA-Strang liegen.

2.2.4. Bestimmung des Verhältnisses von codogenem zu nicht-codogenem DNA-Strang im Nuclease-resistenten ternären Komplex

Da im ternären Elongationskomplex an Poly(dA)(dT) der nicht-codogene DNA-Strang durch die einzelstrangspezifische Nuclease angegriffen wird, muß dieser Teil der DNA im ternären Komplex für die Nuclease zugänglich, also nicht von der Polymerase geschützt sein.

Wir untersuchten, ob der nicht-codogene DNA-Strang durch pankreatische DNase ebenfalls verdaut werden kann.

Bei der Isolierung größerer Mengen des ternären Komplexes an Poly(dA) (dT) durch Sephadex-Gelchromatographie traten Verluste durch Adsorption auf. Deshalb wurde der ternäre Komplex, zusammen mit Bindungskomplex und freier Polymerase, durch Zentrifugation von den Nucleotiden abgetrennt.

³H-Poly(dA) (dT) wurde mit UTP bzw. ATP und RNA-Polymerase bei 37°C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde auf 0°C abgekühlt und auf einen Sucrosetufengradienten aufgeschichtet. Der ternäre Komplex wurde auf den Boden des Röhrchens zentrifugiert. Die Nucleotide im Überstand wurden entfernt. Der Komplex wurde unter den üblichen Bedingungen, jedoch in Gegenwart von 0,3 M NaCl mit DNase und RNase verdaut. Bindungskomplexe zerfallen bei dieser Ionenstärke vollständig (43). Der DNase- und RNase-resistente Komplex wurde gelchromatographisch mit G 100 Sephadex gereinigt und phenolisiert. Die DNA wurde mit Schlangengift-Phosphodiesterase und alkalischer Phosphatase verdaut. Die entstandenen Nucleoside werden dünnschichtchromatographisch analysiert (Abb. 39). Als Kontrolle wurde Poly(dA) (dT) (ohne Polymerase) verdaut und analysiert.

dAMP und dTMP wurden zum Verdau mit Phosphodiesterase und alkalischer Phosphatase zugegeben und dienten bei der anschließenden dünnschichtchromatographischen Analyse als interne Vergleichssubstanzen.

Die DNase- und RNase-resistenten Komplexe an Poly(dA) (dT) enthalten signifikant weniger Nucleotide vom nicht-codogenen Strang (Abb. 39).

Wir schlagen ein Modell des ternären Elongationskomplexes vor, in dem der nicht-codogene DNA-Strang exponiert ist und nicht nur dem Verdau durch einzelstrangspezifische Nuclease zugänglich ist, sondern auch durch pankreatische DNase angegriffen wird.

2.3. Isolierung des ternären Elongationskomplexes an T5-DNA

Für physikalische Untersuchungen des ternären Elongationskomplexes bzw. des DNase- und RNase-resistenten Elongationskomplexes werden größere Mengen an Enzym und DNA benötigt. Die gelchromatographische Abtrennung der Nucleotide und freier Polymerase von größeren Mengen ternären Komplexes ist auf Grund der Viskosität der DNA nicht möglich. Wir trennten den ternären Komplex durch Zentrifugation von den Nucleotiden ab.

³H-T5-DNA (3,6 mg) wurde mit Vollenzym (10 mg) bei mittlerer Ionenstärke und den üblichen Substratkonzentrationen (³²P-ATP 20 Ci/M) für 10 Minuten bei 37°C inkubiert, abgekühlt und auf 1 ml Sucroselösung in einem Zentrifugen-Röhrchen aufgeschichtet. Der ternäre Komplex wurde, zusammen mit Bindungskomplex und freier Polymerase, auf den Boden des Röhrchens zentrifugiert und anschließend mit DNase und RNase verdaut.

Die DNase- und RNase-resistenten Komplexe wurden auf Sucrosegradienten bei niedriger Ionenstärke von den beim Verdau entstandenen Nucleotiden abgetrennt.

Es wurden bei der Zentrifugation zwei Arten von Enzymkomplexen erhalten: Ein schneller sedimentierender Komplex, der Polymerase, DNA und nur wenig

RNA enthält, und ein langsamer sedimentierender Komplex, welcher Polymerase, DNA und RNA enthält.

Durch Analyse der einzelnen Fraktionen des Gradienten im SDS-Polyacrylamidgel konnte gezeigt werden, daß der schneller sedimentierende Komplex aus Vollenzym besteht, während der leichtere Komplex keinen σ -Faktor mehr enthält, wie es vom ternären Komplex zu erwarten ist. Vollenzym sedimentiert ohne DNA wie der schwerere Komplex.

Die Fraktionen, welche den ternären Komplex (Minimalenzym) enthielten, wurden vereinigt und über einen zweiten Sucrosegradienten gereinigt.

Das Verhältnis von RNA zu DNA im isolierten Komplex ist etwa 0,8:1.

In einem Harnstoff-Polyacrylamidgel wurde die Länge von RNA und DNA im DNase- und RNase-resistenten Elongationskomplex bestimmt.

Die Länge der DNA im Komplex beträgt etwa 28 Nucleotide, die Länge der RNA beträgt etwa 19 Nucleotide.

Der auf diese Weise isolierte ternäre Elongationskomplex zeigt ähnliche Eigenschaften (RNA-DNA-Verhältnis, Länge von DNA und RNA) wie der Komplex der über Sepharose 4B gereinigt wurde.

Von Hayashi (76) wurde festgestellt, daß das 3'OH-Ende der wachsenden RNA-Kette bei der Transcription von ϕ X 174 RF I als Hybrid mit der DNA vorliegt. Bremer und Konrad (77) konnten jedoch mit T4-DNA als Matrize kein Hybrid nachweisen.

Wir analysierten die Nucleinsäuren des DNase- und RNase-resistenten ternären Komplexes mittels Cs_2SO_4 -Dichtegradientenzentrifugation. Die Schwimmdichten von doppelsträngiger DNA, DNA-RNA-Hybrid und einzelsträngiger DNA und RNA in Cs_2SO_4 sind so unterschiedlich, daß eine Auftrennung dieser Molekülarten durch Dichtegradientenzentrifugation möglich ist.

Wir beobachteten bei mehreren Experimenten DNA und RNA bei der Dichte des Hybrids. Dieses Resultat war jedoch nicht regelmäßig reproduzierbar.

Von Wang (90) wurde in der Zwischenzeit gezeigt, daß das 3'OH-Ende der RNA-Kette nur bei superhelikalen DNA-Molekülen, nicht aber bei DNA-Molekülen ohne Überstruktur als Hybrid nachgewiesen werden kann.

Wir nehmen daher an, daß die Strecke über die das 3'OH-Ende der RNA-Kette mit dem codogenen DNA-Strang bei der Transcription gepaart ist, zu klein ist, um nach Entfernung der Polymerase an linearen DNAs stabiles Hybrid zu liefern. Die Temperatur- und Ionenstärkebedingungen bestimmen, ob im Cs_2SO_4 -Dichtegradienten Hybride nachzuweisen sind oder nicht.

Dagegen ist bei der Transcription superhelikaler DNA-Moleküle die Ausbildung eines Hybrids energetisch begünstigt, da dabei die Zahl der superhelikalen Windungen reduziert wird (133).

2.4. Modell des Elongationskomplexes

In der Einleitung und in den einzelnen Kapiteln wurden verschiedene Modelle des ternären Elongationskomplexes diskutiert und es wurde gezeigt, daß bestimmte Vorstellungen nicht mit den beschriebenen Ergebnissen in Einklang zu bringen sind.

Wir möchten an dieser Stelle ein Modell des Elongationskomplexes vorstellen, das mit den bekannten Daten übereinstimmt und als Arbeitshypothese für weitere Untersuchungen dienen soll.

Im spezifischen Bindungskomplex schützt die Polymerase einen DNA-Bereich von etwa 40 Nucleotiden vor Abbau durch DNase. Die DNA wird durch die Polymerase über eine Länge von 8 bzw. 16 Nucleotiden aufgewunden. (Saucier und Wang (95) korrigiert nach Wang (124)).

Im Elongationskomplex schützt die Polymerase nur noch einen DNA-Bereich von etwa 26 Nucleotiden vor DNase-Verdau. Wir nehmen an, daß die RNA-Polymerase während der Elongation eine andere Konformation einnimmt und dadurch eine geringere Länge der DNA bedeckt.

Für diese veränderte Raumstruktur spricht auch die erhöhte Resistenz der Polymerase gegenüber Trypsin (85) und Hitzedenaturierung (86). Die Abgabe des σ -Faktors könnte bei dieser Umwandlung eine wichtige Rolle spielen. Bekanntlich bedeckt das Minimalenzym auf der DNA nur noch eine Länge von 7-10 Nucleotiden (134).

Unsere Untersuchungen der Struktur der DNA im ternären Elongationskomplex mit Hilfe der einzelstrangspezifischen Nuclease aus *Neurospora crassa* zeigen, daß die DNA bei der RNA-Synthese aufgewunden wird. Ein Modell der Transcription, bei dem die DNA-Doppelhelixstruktur erhalten bleibt, ist auszuschließen (96).

Dieses Resultat stimmt mit den Ergebnissen von Saucier und Wang (95) und Kosaganov et al. (94) überein.

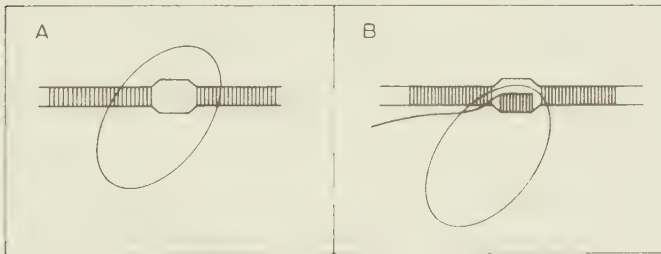
Die Frage, ob bei der Elongation die DNA-Struktur tiefgreifender verändert wird als bei der Bindung der Polymerase kann mit unserer Methode nicht beantwortet werden. Die bekannten Untersuchungen erbrachten einander widersprechende Ergebnisse: Kosaganov et al. berichteten, daß bei der Elongation "Störungen" in der DNA-Struktur auftreten, die bei der Bindung nicht zu beobachten sind, während Saucier und Wang keinen Unterschied zwischen der Struktur der DNA im Bindungskomplex bzw. im Elongationskomplex feststellen konnten.

Wir zeigten, daß der nicht-codogene DNA-Strang dem Abbau durch einzelstrangspezifische Nuclease zugänglich ist. Wir vermuten, daß er an der RNA-Polymerase vorbeigeführt wird (s. Abb. 40).

Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß dieser DNA-Strang zunächst nur über einen kleinen Bereich exponiert ist und daß die Endonuclease die DNA weiter aufwindet und verdaut.

Der nicht-codogene DNA-Strang wird auch beim Abbau des ternären Komplexes mit pankreatischer DNase angegriffen. Es ist möglich, daß der Strang direkt der pDNase zugänglich ist, oder daß durch die Hydrolyse der DNA bis dicht an die Polymerase heran der nicht-codogene Strang destabilisiert wird, nicht mehr so fest an die Polymerase gebunden ist und somit angreifbar wird.

Abb. 40



Über die Länge des RNA-DNA-Hybrids zwischen dem codogenen DNA-Strang und dem 3'OH-Ende der RNA können keine Angaben gemacht werden außer, daß sie so klein ist, daß man nach der Entfernung der Polymerase das Hybrid nur sehr schwer nachweisen kann.

Physikalische Untersuchungen der Struktur der Polymerase und der Nucleinsäuren sollten eine genauere Analyse des in dieser Arbeit beschriebenen DNase- und RNase-resistenten Elongationskomplexes erlauben.

C MATERIAL UND METHODEN

I. Material

1. Substanzen

(³ H)-NAD ⁺	NEN, Dreieichenhain
(³ H)-UTP, (³ H)-ATP	"
(³² P) anorg. Phosphat	"
(¹⁴ C)-NAD ⁺	RCC, Amersham
(¹⁴ C)-ATP	"
(³ H)-dATP, (³ H)-dTTP	"
Triphosphate unmarkiert	Serva, Heidelberg
DEAE-Cellulose	"
Stains all	"
β-NAD ⁺ unmarkiert	Sigma
Kalbsthymus-DNA	"
Poly-L-Lysin	"
Salze	Merck, Darmstadt
FEI-Cellulose-Dünnschichtplatten	"
Cellulose-Dünnschichtplatten	"
DNAse I	Worthington
RNAse	Boehringer, Mannheim
Endonuclease aus <i>N. crassa</i>	"
t-RNA aus <i>E. coli</i>	"
Lysozym (Hühnereiweiß)	"
Poly(dA) (dT)	"
Desoxytriphosphate	"
NMN	"
Cellogelstreifen	Chemetron, Milano
Nitrocellulose-Filter (Ø 0,45 µm)	Sartorius Membranfilter
Biogel A-1,5 m (50-100 mesh)	Biorad
Sephadex 4B, Sephadex G 100, G 75	Pharmacia, Uppsala
Rifampicin, Heparin	Ciba AG, Basel, Geschenk

Histon F1, Salmin A1, Poly-L-Arginin	J. Sonnenbichler
DNA-Polymerase I	H. Schaller
Schlangengift-Phosphodiesterase (frei von Phosphatase)	H.J. Gross
alkalische Phosphatase	"
Oligonucleotide bekannter Kettenlänge	"
Pronase, Trypsin, Proteinase K	H. Fujiki

Bakterien und Phagen:

E. coli B/r	C.D. Goff
E. coli 15 THU ⁻	R. Portmann
T7 ⁺	F.W. Studier
T4 ^{ac-q} , T4mod ⁺ del(39-56)8, T4mod ⁻ del(39-56)10	C.D. Goff
T4 ⁺ , T4amber17	E. Kellenberger
T5 ⁺	R. Schäfer

2. Lösungen

TMA-Puffer: 0,05 M Tris-Acetat pH 7,5, 0,01 M Mg-Acetat, 0,022 M NH₄Cl, 0,01 M β-Mercaptoäthanol, 1 mM EDTA.

TMAG-Puffer enthält zusätzlich zu TMA 10% Glycerin.

TA- bzw. TAG-Puffer entspricht TMA bzw. TMAG, enthält jedoch kein Magnesium.

Tris-Maleinsäure-Puffer (Gomoris): 0,05 M Tris-Maleinsäure-NaOH, 0,01 M Mg-Acetat, 0,022 M NH₄Cl, 0,01 M β-Mercaptoäthanol 1 mM EDTA.

Mix S: 0,15 M Mg-Acetat, 0,6 M NH₄Cl, 0,15 M Tris-Acetat pH 7,9, UTP, GTP, CTP 5 mM jeweils.

Mix S Spezial: 0,1 M Mg-Acetat, 0,6 M NH₄Cl, 0,25 M Tris-Acetat pH 7,9 UTP, GTP, CTP 5 mM jeweils.

Mix NS: 0,03 M Mg-Acetat, 0,25 M NH₄Cl, 0,15 M Tris-Acetat pH 7,9 UTP, GTP, CTP 5 mM jeweils.

II. Methoden

1. Präparative Methoden

a. Isolierung des Alterationsenzyms

10 ml gereinigter T4-Phagen (4×10^{12} PFU/ml) wurden gegen TMA-Puffer dialysiert, mit 10 ml Glycerin gemischt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde DNase (10 mg/ml) zugegeben und die DNA der teilweise lysierten Phagen wurde für 30 Minuten (25°C) verdaut. Die Phagen wurden danach tropfenweise zu 2.5 Litern H_2O zugegeben. Die visköse, opaleszente Lösung wurde mit 275 ml 10x TMA-Puffer versetzt, für 30 Min. mit 500 μg DNase verdaut, durch Ultrafiltration (Amicon-DC-2) auf ein Volumen von 300 ml eingeeengt und danach durch Zugabe von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gefällt (60% Sättigung). Das Präzipitat wurde 20 Min. bei 14 000 Upm in einer Beckman Zentrifuge J-21 abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 15 ml TA-Puffer, der zusätzlich 1,2 M NH_4Cl enthielt aufgenommen und auf einer Bio-gel-Säule (A-1,5m, 3x90 cm) fraktioniert, die mit TA + 1,2 M NH_4Cl äquilibriert worden war. Die einzelnen Fraktionen wurden in Standardtests auf Alterationsaktivität untersucht (Abb. 2). Die von den Phagenpartikeln abgetrennte Enzymfraktion wurde durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung (60%) konzentriert, gegen TMAG-Puffer dialysiert und auf eine DEAE-Cellulosesäule (1,1x 14 cm, Puffer:TMAG) aufgepumpt. Die Transferase erschien im Durchfluvolumen. Durch einen Saligradienten (2x130 ml; 0-0,6 M NH_4Cl in TMAG) wurden nur inaktive Proteine eluiert. Die Fraktionen des Durchfluvolumens wurden vereinigt und in Aliquoten in flüssigem Stickstoff eingefroren und aufbewahrt.

b. Anreicherung des Alterationsenzyms aus T4-präinfizierten Zellen

Die mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gefällten Proteine eines Rohextraktes von T4-infizierten Zellen (s. l.k.) (2,5 Min. nach Infektion geerntet) wurden in einem kleinen Volumen TAG + 1,2 M NH_4Cl ge-

löst und mittels einer Biogelsäule fraktioniert. Die weitere Anreicherung wurde wie in l.a. beschrieben durchgeführt.

c. Gewinnung von Rohextrakten aus T4-präinfizierten E. coli-Zellen

In Belüftungsflaschen (14 l) wurde E. coli B/r (Medium nach Goff (31)) bei einer Zelldichte von 5×10^8 mit einer MOI von 8-10 Phagen infiziert. Mit Druckluft wurden zu verschiedenen Zeiten 1,5 l aus der Flasche auf 1 kg Eis (mit 25 ml 1 M NaN_3) gepumpt (Zeitdauer 4-11 Sekunden). Die Zellen wurden in einer mitteltourigen Zentrifuge abzentrifugiert und 1 mal mit Medium gewaschen. Die Bakterien (3,5 g) wurden mit 3,5 ml TMAG versetzt, homogenisiert und mit einer "French-press" (Aminco) bei 1000 psi aufgeschlossen.

Die DNA der Lysate wurde mit DNase verdaut (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 30 Min. 0°C). Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt. Die Proteine des Rohextrakts wurden mit Ammoniumsulfat gefällt (50%). Der Niederschlag wurde durch Zentrifugation gesammelt und je nach Verwendungszweck in verschiedenen Puffern aufgenommen.

Für die Gewinnung von Rohextrakten aus größeren Mengen von Zellen wurden diese in einer "Gaulin-press" bei $600 \text{ kg}/\text{cm}^2$ aufgeschlossen.

d. Isolierung von ADP-ribosyliertem Lysozym und Poly-L-Arginin

150 μg Lysozym (1 mg Poly-L-Arginin) wurden mit 21 μg (15 μg) Transferase unter Standardbedingungen ($^3\text{H-NAD}^+$ 50 Ci/M) bzw. $^{14}\text{C-NAD}^+$ 200 Ci/M) bei 15°C für 7 (24) Stunden inkubiert. Das umgesetzte Lysozym (Poly-L-Arginin) wurde durch Chromatographie auf einer G 50 Sephadex-Säule (1x60 cm, Puffer TMAG bzw. H_2O) von Transferase und nicht umgesetztem NAD^+ abgetrennt (4-6 ml/Stunde Durchflußrate). Fraktionen, welche markiertes Lysozym (Poly-L-Arginin) enthielten, wurden vereinigt und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

e. Zucht und Reinigung der Bakteriophagen T4 und T7

T4- und T7-Phagen wurden nach Schäfer (114) gewonnen. Nach dem CsCl-Stufengradienten wurde jedoch noch ein CsCl-Gleichgewichtsgradient zur Nachreinigung der Phagen angeschlossen.

Für die Gewinnung von T7-Phagen und T5-Phagen mit ^3H -markierter DNA wurde *E. coli* 15 THU⁻ in M9-Medium (135), das zusätzlich 30 mg Uridin, 40 mg Histidin und 5 mg Thymidin pro Liter enthielt, bei einer Zelldichte von 5×10^8 mit MOI 5 infiziert. Bei der Infektion wurden 5 mCi/l ^3H -Thymidin (20 Ci/mM) zugegeben.

Für die Gewinnung von T7-Phagen mit ^{32}P -markierter DNA wurde *E. coli* CR 63 in H-Medium (136) gezüchtet. Eine halbe Generationszeit vor Infektion (s.o.) wurden 25 mCi/l ^{32}P -anorganisches Phosphat zugegeben.

f. Isolierung der Phagen-DNA

Die DNA aus unmarkierten und markierten Phagen wurde nach Schäfer (114) isoliert.

g. Präparation von ^3H -markiertem Poly(dA) (dT)

Ein Syntheseansatz (Gesamtvolumen 500 μl) enthielt 7,6 μg (34 Enzymeinheiten) DNA-Polymerase I, 0,5 mM dATP und dTTP (50 Ci/M), 1 OD₂₆₀ Einheit/ml Poly(dA) (dT) und 0,05 M Tris-Cl pH 7,7, 0,005 M MgCl_2 und 5 mM β -Mercaptoäthanol. Nach 20 Minuten bei 37°C wurden 125 μl 5 M NaCl und 50 μl 0,3 M EDTA zugesetzt. Der Ansatz wurde durch 3-maliges Phenolisieren (Phenol war mit 1 M NaCl gesättigt) von Protein befreit. Die wässrigen Phasen wurden mit Chloroform extrahiert und gegen 0,01 M Tris pH 7,5, 0,02 M NaCl dialysiert.

Alle Präparationen wurden in einem alkalischen CsCl-Gradienten als Poly(dA) (dT) charakterisiert.

Die Präparationen wurden durch sucrosegradientenzentrifugation von Oligonucleotiden befreit

h. Isolierung der RNA-Polymerase aus *E. coli*

Die RNA-Polymerase aus *E. coli* wurde nach (137) isoliert. Als weiterer Reinigungsschritt wurde eine DNA-Agarose-Säule angeschlossen (138). Die RNA-Polymerasepräparation war frei von DNase und RNase.

i. Isolierung des ternären Elongationskomplexes an T7-DNA

α. Zur Gewinnung des Nuclease-resistenten Elongationskomplexes

Die Ansätze enthielten 100 μ l 32 P-T7-DNA (0,5 mg/ml, 100 000 cpm/ μ g), 3 μ l E σ (1,7 bzw. 17 mg/ml) 40 μ l Mix S Spezial, 10 μ l ATP- 3 H (10 mM 500 Ci/M), 50 μ l H₂O, 2 μ l BSA (10 mg/ml). Sie wurden 10 Min. bei 37°C inkubiert, mit 35 μ l 0,15 M EDTA pH 9,2 und 200 μ l Sepharose 4B-Elutionspuffer versetzt und bei 4°C auf einer Sepharose 4B-Säule (0,7x15 cm) aufgetrennt (11 ml/Stunde, Fraktionsgröße 250 μ l). 2 μ l-Aliquote wurden in Brayscintillator gelöst und gezählt. Die OD₂₆₀ wurde in einem "Cecil"-Durchflußphotometer bestimmt. Elutionspuffer: 0,04 M Tris-Cl pH 7,9, 0,01 M NaCl, 1 mM EDTA, 5% Glycerin.

β. Zur Analyse durch die Endonuclease aus *N. crassa*

20 μ l 3 H-T7-DNA (1,2 μ g = 100 000 cpm), 50 μ l NS-Mix, 25 μ l ATP, 0,25 - 25 μ g E σ , 155 μ l H₂O wurden 1 Stunde bei 37°C inkubiert, mit 250 μ l Elutionspuffer versetzt und bei 4°C über eine Sepharose 4B-Säule (s.o.) von den Substraten abgetrennt. Elutionspuffer: 0,1 M NaCl, 0,015 M Tris-Cl pH 7,9, 5 mM MgCl₂, 3 mM β-Mercaptoäthanol.

j. Isolierung des ternären Elongationskomplexes an Poly(dA) (dT)

α. Gelchromatographische Isolierung

3 H-Poly(dA) (dT) (10 μ g = 60000 cpm) wurden bei niedriger Ionenstärke mit E σ (80 μ g) in Gegenwart von 1 mM ATP bzw. UTP für

10 Minuten bei 37°C inkubiert, abgekühlt und auf eine Sephadex G 75-Säule (1x15 cm) aufgetragen. Derselbe Elutionspuffer wie in i.B. jedoch mit zusätzlich 0,01% Brij wurde verwendet.

B. Zentrifugation

³H-Poly(dA)(dT) (31 µg) wurden bei niedriger Ionenstärke mit E⁻ (190 µg) und 1 mM ATP bzw. UTP (Gesamtvolumen 500 µl) 10 Min. bei 37°C inkubiert, auf 0°C abgekühlt, in ein Zentrifugenröhrchen gegeben, das 2 ml 15%ige Sucrose in TAG und (darüber) 2,7 ml TAG enthält, und für 24 Stunden bei 50 000 UPM im SW 50.1-Rotor bei 4°C zentrifugiert (Beckman Rotor).

k. Isolierung des DNase- und RNase-resistenten Elongationskomplexes an T7-DNA

Die vereinigten Fraktionen des Ausschlußvolumens der Sepharose 4B-Säule (s. i. c.) werden mit CaCl₂ und MgCl₂ versetzt (Endkonzentration je 0,01 M) 30 Min. mit 100 µg/ml DNase und weitere 30 Min. mit zusätzlich 100 µg/ml DNase und 100 µg/ml RNase bei 37°C inkubiert. (Die RNase war 10 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt worden.) Der DNase-Abbau wurde durch Zugabe von EDTA gestoppt. Der Hydrolyse-Ansatz wurde auf eine Sephadex G 100-Säule (1x60 cm) aufgetragen. Elutionspuffer: 0,02 M Tris-Cl pH 7,9, 1 mM EDTA, 0,01 mM β-Mercaptoäthanol, 5% Glycerin. Durchflußrate 4 ml/Stunde, Fraktionsgröße 600 µl. 50 µl Aliquote wurden in Brayscintillator gelöst und gezählt.

1. Isolierung des DNase- und RNase-resistenten Elongationskomplexes an T5-DNA

3,6 ml ³H-T5-DNA (1 mg/ml) wurden mit 600 µl ATP + ³²P (20 Ci/M; 10 mM), 1,2 ml Mix S, 200 µl Es (50 mg/ml) und 400 µl H₂O für 10 Minuten bei 37°C inkubiert, auf 1 ml Sucroselösung (10%

Sucrose in TMAG) in 2 Zentrifugenröhrchen des SW 50.1 Rotors überschichtet und 15 Stunden bei 50 000 Upm zentrifugiert. Die Sedimente wurden 3mal mit Inkubationspuffer gewaschen (50 mM Tris-Cl pH 8,0, 10 mM $MgCl_2$, 0,1 mM EDTA, 0,05 mM β -Mercaptoäthanol), in je 100 μ l dieses Puffers suspendiert und mit DNase (250 μ g) und RNase (100 μ g) bei 37°C inkubiert. Nach 60 Min. wurde 15 μ l 0,1 M EDTA zugegeben. Die Nuclease-resistenten ternären Komplexe wurden in Sucrosegradienten (10-30% Sucrose 5-10% Glycerin in 50 mM Tris-Cl pH 7,9, 10 mM $MgCl_2$, 20 mM NH_4Cl , 0,02 M β -Mercaptoäthanol, 1 mM EDTA) von den bei der Hydrolyse entstandenen Nucleotiden abgetrennt (11 Stunden SW 50.1 50 000 Upm).

2. Quantitative Bestimmungsmethoden

a. DNA: Die DNA-Konzentration wurde nach Dische (139) oder durch Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt ($E_{260}^{1\%} = 20 \text{ mg}^{-1} \text{ ml}^{-1}$).

b. Protein: Die Proteinkonzentration wurde nach Heil und Zillig (140) bestimmt.

c. Radioaktivität: Impulsraten wurden in einem Nuclear Chicago Mark 2 Flüssigkeitsscintillator-Spektrometer gemessen.

Scintillationsflüssigkeiten: Toluolscintillator: 9,0 g PPO
1,125 g POPOP
2,5 l Toluol
Brayscintillator: 4 g PPO
0,2 g POPOP
60 g Naphthalin
100 ml Methanol
20 ml Äthylen-glycol
ad 1 l mit Dioxan

d. RNA-Synthesetest

Standard-Ansatz (mittlere Ionenstärke): 0,03 M Mg-Acetat, 0,12 M NH_4Cl , 0,03 M Tris-Acetat pH 7,9.

Der Testansatz (0,25 ml) enthielt neben den Salzen: je 0,25 μMol GTP, UTP, CTP, 0,25 μMol ^{14}C -ATP, 20-50 μg T7- bzw. T4-DNA und RNA-Polymerase in den angegebenen Mengen. Die Lösungen wurden bei 0°C zusammengegeben, gerührt und bei 37°C 10 Minuten inkubiert. Durch Zugabe von 2 ml Eiswasser wird die Synthese beendet. Säureunlösliche PNA wird mit 2 ml 10%iger TCA gefällt und durch Nitrocellulose-Filter abgesaugt. Durch Waschen der Filter mit 3x20 ml 5%iger TCA wird überschüssiges ATP entfernt. Die Radioaktivität auf dem Filter wird bestimmt (79) nachdem die Filter getrocknet sind (15 Min. 90°C).

Standardansatz (niedere Ionenstärke) 0,006 M Mg-Acetat, 0,05 M NH_4Cl , 0,03 M Tris-Acetat pH 7,9.

e. Test der Alterationsreaktion (Standardtest)

Die Ansätze (0,1 ml) enthielten 2,1 μg gereinigtes Alterationsenzym, 15 μl Lysozym, 0,025 μMole ^3H - NAD^+ (25 Ci/M oder 50 Ci/M) in TMAC-Puffer. Die Ansätze wurden 30 Min. bei 15°C inkubiert. Danach wurden die Proteine wie in d. beschrieben mit TCA gefällt, abgesaugt und gewaschen. Die Radioaktivität auf dem Filter wurde bestimmt.

f. Endonuclease-Test

1-5 μg ^3H -T7-DNA (100 000 cpm) wurden mit 0,005 U/ml der Endonuclease in Gegenwart von 0,01 M NaCl, 0,015 M Tris-Cl pH 7,9, 0,005 M MgCl_2 , 1 mM β -Mercaptoethanol bei 37°C inkubiert (Gesamtvolumen 500 μl). Aliquote wurden entnommen und in Gegenwart von 1 mg/ml Kalbsthymus-DNA in 5%iger TCA gefällt. Das Präzipitat wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäßen unter Verwendung von Adapteren für den JA-21 Rotor der J 21-Zentrifuge von Beck-

man 20 Min. bei 21 000 Upm abzentrifugiert. Aliquote des Überstands wurden in Brayscintillator gelöst und gezählt.

3. Analytische Methoden

a. Dünnschichtchromatographische Methoden

Zur Trennung von Nicotinamid, NAD^+ , NMN und Nicotinamid-Ribose wurden Cellulose-Dünnschichtplatten eingesetzt.

Laufmittel A: Isobuttersäure/ $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_3/\text{EDTA} = 66/33/1/10^{-4}$ M (141). Laufmittel B: 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /n-Propanol = 100/60/2 (v/w/v).

Zur Trennung von ADP und ADP-Ribose wurden PEI-Cellulose-Dünnschichtfolien verwendet. Die Platte wurde ohne Zwischentrocknung mit Natriumformiatpuffern verschiedener Konzentration entwickelt (50).

Nach der Entwicklung wurde die Cellulose, der durch die UV-Absorption der zugesetzten Referenzsubstanzen gekennzeichneten Bereiche abgekratzt und in Toluolscintillator suspendiert.

b. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Polyacrylamid-Plattengele wurden nach Lämmli (142) hergestellt. Exponentielle Gradientengele (5-25%) wurden nach Mirault und Scherrer hergestellt (39).

c. Bestimmung der Kettenlänge von DNA und RNA im Nuclease-resistenten Komplex an T7-DNA

Die vereinigten Fraktionen der Sephadex G 100-Säule (s. 1.1.) wurden mit 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ t-RNA versetzt, 2mal phenolisiert und mit 2,5 Volumen Äthanol in Gegenwart von 0,2 M Kacetat gefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert (2 Stunden 35 000 Upm SW 41) und nach Heyden et al. (108) auf einem Polyacrylamid-

plattengel (12% Acrylamid 7 M Harnstoff) analysiert (100 V 9 mA). RNA-Oligonucleotidketten mit 12, 19, 35 Nucleotiden sowie t-RNA und 5S-RNA wurden mit aufgetragen. Die Referenz-RNA-Ketten wurden mit "strains all" angefärbt. Die Bahn in der die radioaktiven Nucleinsäuren aufgetrennt worden waren, wurden in 2 mm breite Streifen geschnitten. Die Streifen wurden mit 0,25 M NaCl eluiert. Das Eluat wurde in Brayscintillator gelöst.

d. Identifizierung der aus Elongationskomplexen an Poly(dA) (dT) durch die Endonuclease freigesetzten Nucleotide

Mehrere Präparationen ternärer Komplexe an Poly(dA) (dT) mit ATP bzw. UTP als Substrat (s. 1.j.) wurden vereinigt und unter Standardbedingungen für 3 Stunden mit Endonuclease inkubiert und anschließend mit TCA gefällt. Die gefällte DNA wurde abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 2 M Tris auf pH 7,7 eingestellt, mit H₂O auf das 10-fache Volumen verdünnt, mit je 50 µg dTMP und dAMP versetzt und auf eine DEAE-Cellulose-Säule (0,5x2,5 cm) aufgepumpt, die mit 0,01 M Triäthanolamin-carbonat-Puffer (TEAB) pH 8,0 äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit 20 ml H₂O und 70 ml 0,01 M TEAB gespült. Die Oligonucleotide wurden mit 2 M TEAB eluiert. Die vereinigten Fraktionen wurden einrotiert. Die Oligonucleotide wurden in 10 µl H₂O gelöst, mit 5 µl 0,15 M TEAB pH 8,0, 2 µl Phosphodiesterase (0,2 mg/ml) und 2 µl alkalischer Phosphatase (1 mg/ml) versetzt, 2 Stunden bei 37°C inkubiert, lyophilisiert, in 5 µl H₂O aufgenommen und auf eine Cellulosedünnschichtplatte aufgetragen. Laufmittel: H₂O.

e. Identifizierung der Nucleotide im Nuclease-resistenten Komplex an Poly(dA) (dT)

Der ternäre Komplex an Poly(dA) (dT) (Zentrifugationsmethode 1.j.8.) wird in 0,05 M Tris-Cl pH 7,9, 0,3 M NaCl, 0,01 M MgCl₂, 0,01 M CaCl₂ mit 100 µg/ml DNase für 60 Min. und mit weiteren 100 µg

DNase und 100 µg RNase weitere 60 Minuten inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit 200 µl 0,15 M EDTA versetzt und auf eine Sephadex G 100-Säule aufgetragen. Der isolierte Nuclease-resistente Komplex wurde wie üblich (2.c.) phenolisiert. Die DNA wurde mit Äthanol gefällt und abzentrifugiert. Das Sediment wurde mit Phosphodiesterase und alkalischer Phosphatase inkubiert und auf Cellulose-Dünnschichtplatten analysiert wie oben beschrieben.

f. Test der ADP-Ribosylierung von PNA-Polymerase, Histon Fl, Salmin A1, Poly-L-Lysin, Poly-L-Arginin und anderer Proteine

Unter den Standardbedingungen wurden (50 bzw. 100 µl Gesamtvolumen) bei 15°C folgende Mengen der Proteine in vitro alteriert: 35 µg RNA-Polymerase, 50 µg je Histon Fl, Salmin A1 Poly-L-Lysin und Poly-L-Arginin, 15 µg BSA. Inkubationsdauer wie im Versuch angegeben. Folgende Methoden wurden zur Analyse der Reaktionsprodukte eingesetzt:

α. TCA-Fällung s. Standardtest (2.e.)

β. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

50 µl Alterationsansätze wurden nach der Inkubation mit 25 µl doppelt konzentriertem Lämmli-Proben-Puffer versetzt, 3 Min. auf 100°C erhitzt und dann in 9 mm breite Taschen eines SDS-Polyacrylamid-Plattengels eingefüllt. Nach der Elektrophorese wurden die Proteinbanden mit Coomassie brilliant blue angefärbt und aus dem Gel ausgeschnitten. Die Radioaktivität in den Gelscheibchen wurde unter Verwendung eines Verbrennungsautomaten (Intertechnik "Oxymat") bestimmt.

γ. Cellogel-Elektrophorese

Die Ansätze wurden nach der Reaktion mit 7 Volumen Aceton versetzt. Die Fällung wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäßen unter Verwendung von Adaptoren 10 Minuten bei 21 000 Upm abzentrifugiert (Beckman J 21). Das Sediment wurde mit 300 µl

100%igem Aceton gewaschen, getrocknet und anschließend in 5 μ l 0,1 M NH_4HCO_3 pH 9,2, 0,01 M β -Mercaptoäthanol, 6 M Harnstoff gelöst und auf einen Cellogelelektrophoresestreifen aufgetragen, der mit dem Elektrodenpuffer äquilibriert worden war (0,2 M NH_4HCO_3 pH 9,2, 0,02 M β -Mercaptoäthanol, 0,015 M EDTA, 6 M Harnstoff). Der Bicarbonat-Puffer wurde für die Analyse der ADP-Ribosylierung von Histon Fl und Salmin A1 verwendet.

Bei der Trennung der Polymerase-Untereinheiten wurde als Elektrodenpuffer 0,6 M Ammoniumborat pH 9,2, 0,01 M EDTA, 0,02 M β -Mercaptoäthanol, 6 M Harnstoff verwendet. (Auftragpuffer: 0,2 M Ammoniumborat pH 9,2, 0,005 M EDTA, 0,02 M β -Mercaptoäthanol, 6 M Harnstoff.)

Elektrophoresebedingungen: 1000 V, 20 mA, 2 Stunden.

Nach der Elektrophorese wurden die Proteinbanden mit Amidoschwarz angefärbt. Die Bahnen wurden mit einem Mickle-Gelschneidegerät in 1 mm breite Streifen geschnitten. Die Streifen wurden getrocknet und in Toluolszintillator gegeben.

d. Immunpräzipitation

Die Polymerase wurde aus Rohextrakten von E. coli-Zellen mit Antikörper (aus Ziegen) gegen Polymerase ausgefällt. Das Immunpräzipitat wurde dann in Lämmli-Proben-Puffer dissoziiert und in einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert.

e. Fällung mit t-RNA

ADP-ribosyliertes Poly-L-Lysin und Poly-L-Arginin wurden nach der Reaktion (Ansatzvolumen 100 μ l) durch Zugabe von 20 μ l einer Lösung von t-RNA in H_2O (10 μ g/ml) gefällt. Nach 10 Min. bei 0°C wurden 1 ml TMA-Puffer zugegeben. Anschließend wurden die Ansätze durch Nitrocellulose-Filter abgesaugt. Die Filterchen wurden mit 3x10 ml TMAG-Puffer gewaschen und danach getrocknet. Radioaktivitätsbestimmung wie üblich.

D. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Alteration der RNA-Polymerase nach Infektion der Bakterienzellen durch den Bakteriophagen T4 wird durch ein Protein verursacht, das Bestandteil des Phagen ist, und bei der Infektion zusammen mit der DNA in die Zelle eingebracht wird.
2. Das alterierende Enzym wurde aus osmotisch geschockten T4⁺-Phagen isoliert. Es besitzt ein Molekulargewicht von 70 000 und ist als Monomer aktiv. Bei 37°C wird das Enzym irreversibel in eine weniger aktive Form umgewandelt.
3. Das Enzym alteriert in vitro alle Untereinheiten der RNA-Polymerase und andere Proteine. Nur die Hälfte der α -Untereinheiten wird alteriert. Die α -Untereinheiten in modifizierter Polymerase werden nicht umgesetzt. Wahrscheinlich reagieren alterierendes und modifizierendes Enzym mit derselben Stelle in der α -Untereinheit. Die Akzeptoraktivität verschiedener Proteine steigt mit zunehmendem Gehalt an Arginin an. Poly-L-Arginin ist ein ausgezeichnetes Substrat, Poly-L-Lysin wird nicht alteriert.
4. Bei der Alterationsreaktion entsteht aus dem Substrat NAD⁺ freies Nicotinamid. Durch längere Inkubation bei 37°C kann ADP-Ribose aus alterierten Proteinen abgespalten werden.

Das Enzym überträgt folglich einen ADP-Riboserest aus NAD⁺ auf Argininreste in verschiedenen Proteinen. Die Reaktion ist nicht reversibel. Das Enzym ist kein Poly-ADP-ribosylierendes Enzym. Es wurde für NAD⁺ eine K_m app von 0,05 mM bestimmt.
5. Aus den Stabilitätseigenschaften der Bindung zwischen ADP-Ribose und Protein kann man folgern, daß der ADP-Riboserest mit der Guanidinium-Gruppe des Arginins als N-Ribosid verknüpft ist.

6. Das Enzym wurde aus T4-infizierten Zellen angereichert.
Die Aktivität wurde nur in Zellen gefunden, die mit T4D, T4mod⁻ und T4mod⁺ infiziert worden waren, jedoch nicht in Zellen, die mit T4alt⁻ infiziert worden waren. Das Maximum der Aktivität wird 1 Minute nach Infektion erreicht.
7. Normale Polymerase und in vivo oder in vitro alterierte Polymerase unterscheiden sich nicht signifikant in ihrer RNA-Synthesekapazität an T4-, T7- und Kalbsthymus-DNA.
8. Da in Alteration und Modifikation dieselbe Stelle in der α -Untereinheit ADP-ribosyliert wird, ist anzunehmen, daß die Alteration wie die Modifikation auf der Transkriptionsebene in den Stoffwechsel des T4-infizierten Bakteriums eingreift.
9. Ternärer Elongationskomplex an T7-DNA wurde durch Gelchromatographie mit Sepharose 4B isoliert.
Die Methode erlaubt eine Abtrennung des ternären Komplexes von Bindungskomplex und freier Polymerase.
10. Im ternären Elongationskomplex schützt die RNA-Polymerase eine DNA-Kette von 26 ± 3 Nucleotiden und eine RNA-Kette von 22 ± 4 Nucleotiden vor DNase- und RNase-Verdau.
11. In der DNA des ternären Elongationskomplexes können mit der einzelstrangspezifischen Nuclease aus *Neurospora crassa* einzelsträngige Bereiche nachgewiesen werden.
Die Zahl der einzelsträngigen Regionen ist von der Zahl der Polymerasemoleküle pro DNA-Molekül abhängig.
12. Im ternären Elongationskomplex an Poly(dA)(dT) greift die einzelstrangspezifische Nuclease nahezu ausschließlich den nicht-codogenen DNA-Strang an.

13. Größere Mengen von DNase- und RNase-resistentem ternären Elongationskomplex wurden durch Sucrosegradientenzentrifugation isoliert.
14. Die Ergebnisse schließen ein Modell der Transcription aus (96), bei dem die DNA-Doppelhelix nicht aufgewunden wird. Nach dem von uns vorgeschlagenen Modell werden die DNA-Stränge bei der Transcription über eine nicht bekannte Strecke voneinander getrennt. Der nicht-codogene Strang wird dabei exponiert und kann von der einzelstrangspezifischen Nuclease und pankreatischer DNase angegriffen werden.

E LITERATURVERZEICHNIS

Abkürzungen von Zeitschriftentiteln, die offiziell nicht verwendet werden:

BBRC	Biochem. Biophys. Res. Commun.
CSHSQB	Cold Spring Harbor Symposium of Quantitative Biology
JMB	Journal of Molecular Biology
JBC	Journal of Biological Chemistry
PNAS	Proc. Nat. Acad. Sci. USA

- 1.) Griffith, F. (1928) J. Hyg. Camb. 27, 113
- 2.) Avery, O.T., MacLeod, C.M., McCarty, M. (1949) J. Exp. Med. 79, 137
- 3.) Hershey, A.D., Chase, M. (1952) J. Gen. Physiol. 36, 39
- 4.) Watson, J.D., Crick, F.A. (1953) Nature 171, 737
- 5.) Crick, F.A. (1958) Symp. Soc. Exp. Biol., The Biological Replication of Macromolecules XII, 138
- 6.) Weiss, S.B., Gladstone, L. (1959) J. Amer. Chem. Soc. 81, 4118
- 7.) Hurwitz, J., Bressler, A., Diring, R. (1960) BBRC 3, 15
- 8.) Jacob, F., Monod, J. (1961) JMB 3, 318
- 9.) Englesberg, E., Irr, I., Power, J., Lee, N. (1965) J. Bacteriol. 90, 946
- 10.) Seifert, W., Quasba, P., Walter, G., Palm, P., Schachner, M., Zillig, W. (1969) Eur. J. Biochem. 9, 319
- 11.) Stent, G.S. (1963) Molecular biology of bacteriophages, W. Freeman u. Co., San Francisco
- 12.) Kennell, D. (1968) J. Virol. 2, 1262
- 13.) Hayward, W.S., Green, M.H. (1965) PNAS 54, 1675
- 14.) Landy, A., Spiegelman, S. (1968) Biochemistry 7, 585
- 15.) Ennis, H.L., Cohen, P.S. (1968) Virology 36, 193

- 16.) Volkins, E. (1960) PNAS 46, 1336
- 17.) Horvitz, R. (1974) JMB 90, 727
- 18.) Horvitz, R. (1974) JMB 90, 739
- 19.) Adesnik, M., Levinthal, C. (1970) JMB 48, 187
- 20.) Salser, W., Bolle, A., Epstein, R. (1970) JMB 49, 271
- 21.) Brody, E., Sederoff, R., Bolle, A., Epstein, R. (1970) CSHSQB 35, 203
- 22.) O'Farrell, P., Gold, L. (1973) JBC 248, 5502
- 23.) O'Farrell, P., Gold, L. (1973) JBC 248, 5512
- 24.) Rabussay, D., Geiduschek, E.P. (1976) in: "Comprehensive Virology"
- 25.) Chamberlin, M., McGrath, J., Waskell, L. (1970) Nature 228, 227
- 26.) Dunn, J.J., Bautz, F.A., Bautz, E.K.F. (1971) Nature New Biol. 230, 94
- 27.) Walter, G., Seifert, W., Zillig, W. (1968) BBRC 30, 240
- 28.) Goff, C., Weber, K. (1970) CSHSQB 35, 101
- 29.) Seifert, W., Rabussay, D., Zillig, W. (1971) FEBS-Letters 16, 175
- 30.) Haselkorn, R., Vogel, M., Brown, R. (1969) Nature 221, 836
- 31.) Goff, C. (1974) JBC 249, 6181
- 32.) Zillig, W., Fujiki, H., Mailhammer, R. (1975) J. Biochem. 77, 1
- 33.) Mailhammer, R., Yang, H.L., Reiness, G., Zubay, G. (1975) PNAS 72, 4928
- 34.) Showe, K.K., Kellenberger, E. in: "Control processes in Virus Multiplication", D.C. Burke & W.C. Russell eds. Cambridge University Press 1975
- 35.) Schachner, M., Seifert, W., Zillig, W. (1971) Eur. J. Biochem. 22, 520
- 36.) Duckworth, D.H. (1970) Bacteriological Reviews 34, 344
- 37.) Kellenberger, E., Arber, W. (1955) Z. Naturforsch. 10b, 698
- 38.) Weber, K., Osborn, M. (1969) JBC 244, 4406
- 39.) Mirault, M.E., Scherrer, K. (1971) Eur. J. Biochem. 23, 372

- 40.) Dickson, P., Barnes, S., Eiserling, F. (1970) JMP 53, 461
- 41.) Kellenberger, E., Leibo, S.P., Kellenberger-van der Kamp, C., Steinberg, C.M. in Vorbereitung
- 42.) Alberts, B.M., Amodia, F.J., Jenkins, M., Gutman, E., Ferris, F. (1968) CSHSQB 33, 289
- 43.) Hinkle, D.C., Chamberlin, M.J. (1972) JMB 70, 158
- 44.) Gumpert, R.J., Lehman, J.R. (1971) PNAS 68, 2559
- 45.) Laidler, K.J., Bunting, P.S. (1973) The Chemical Kinetics of Enzyme Action, Clarendon Press, Oxford
- 46.) Worcel, A., Goldman, D.S., Cleland, W.W. (1965) JBC 240, 3399
- 47.) Rabussay, D., Mailhammer, P., Zillig, W. (1972) in "Metabolic Interconversion of Enzymes" (O. Wieland, E. Helmreich, H. Holzer, eds.) 213 Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- 48.) Fujiki, H., Palm, P., Zillig, W., Calendar, R., Sunshine, M. (1976) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 315
- 49.) Collier, R.J. (1975) Bacteriological Reviews 39, 54
- 50.) Randerath, K. (1965) in: "Dünnschichtchromatographie" S. 236, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstrasse
- 51.) Sugimura, T. (1973) Progr. Nucleic Acid Res. 13, 127
- 52.) Shabarova, Z.A. (1970) Progr. Nucleic Acid Res. 10, 145
- 53.) Berg, P. (19-6) JBC 222, 1015
- 54.) Sanger, F., Tuppy, H. (1951) Biochem. J. 49, 463
- 55.) Warner, R.C., Carman, R.K. (1942) JBC 142, 725
- 56.) Stegmann, H. (1958) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 312, 255
- 57.) Toi, K., Bynum, E., Norris, E., Itano, H.A. (1967) JBC 242, 1036
- 58.) Kitteredge, J.S., Roberts, E., Simonsen, D.G. (1962) Biochemistry 1, 624
- 59.) Ellis, G.P., Honeyman, J. (1955) Adv. Carbohydrate Res. 10, 95
- 60.) Marshall, R.D., Neuberger, A. (1970) Adv. Carbohydrate Res. 25, 407

- 61.) Warburg, O., Christian, W., Giese, A. (1935) Biochem. Z. 282, 157
- 62.) Nishizuka, Y., Ueda, K., Yoshihara, K., Yamamura, H., Takeda, M., Hayashi, O. (1969) 34, 781
- 63.) Piechowski, M.M., Susman, M. (1967) Genetics 56, 133
- 64.) Silver, S. (1967) JMB 29, 191
- 65.) Vanderslice, R.W., Yegian, C.D. (1974) Virology 60, 265
- 66.) Coppo, A., Manzi, A., Pulitzer, J., Takahashi, H. (1973) JMB 76, 61
- 67.) Goff, C. (1974) in: "Metabolic Interconversion of Enzymes" (Fischer, E.H., Krebs, E.G., Neurath, H., Stadtman, E.R., eds.) S. 235, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- 68.) Schäfer, R., Zillig, W. (1973) Eur. J. Biochem. 33, 215
- 69.) Regueiro, B., Amelunxen, R., Grisolia, S. (1962) Biochemistry 1, 553
- 70.) Tremblay, G.Y., Daniels, M.J., Schaechter, M. (1969) JMB 40, 65
- 71.) Milanesi, G., Brody, E.N., Geiduschek, E.P. (1969) Nature 221, 1014
- 72.) Bautz, E.K.F., Bautz, F.A., Dunn, J.J. (1969) Nature 223, 1022
- 73.) Hager, G., Hall, B.D., Fields, K. (1970) CSHSQB 35, 233
- 74.) Nomura, M., Witten, C., Mantei, N., Echols, H., (1966) JMB 17, 273
- 75.) Dulbecco, R. (1952) J. Bact. 63, 209
- 76.) Hayashi, M. (1965) PNAS 54, 1736
- 77.) Bremer, H., Konrad, M.W. (1964) PNAS 51, 801
- 78.) Richardson, J.P. (1966) JMB 21, 115
- 79.) Fuchs, E., Millette, R.R., Zillig, W., Walter, G. (1967) Eur. J. Biochem. 3, 183
- 80.) So, A., Downey, K. (1970) Biochemistry 9, 4788
- 81.) Sippel, A., Hartmann, G. (1968) Biochim. Biophys. Acta 157, 218
- 82.) Zillig, W., Zechel, K., Rabussay, D., Schachner, M., Sethi, V., Palm, P., Heil, A., Seifert, W. (1970) CSHSQB 35, 47

- 83.) Chambon, P., Ramuz, M., Mandel, P., Doly, J. (1967) Biochim. Biophys. Acta 149, 584
- 84.) Novak, R.L., Doty, P. (1968) JBC 243, 6068
- 85.) Khesin, R.B., Astaurovia, O.B., Shemayakin, M.F., Kamzolina, S.G., Manyakov, V.F. (1967) Mol. Biol. 1, 617
- 86.) Novak, R.L. (1970) Biochemistry 9, 1739
- 87.) Beabealashvily, R., Ivanov, V., Minchenkova, L., Savochkina, L. (1972) Biochim. Biophys. Acta 259, 35
- 88.) Travers, A., Burgess, R. (1969) Nature 222, 537
- 89.) Krakow, J., v.d. Helm, K. (1970) CSHSQB 35, 73
- 90.) Wang, J.C. (1974) JMB 87, 797
- 91.) Niyogi, S., Stevens, A. (1965) JBC 240, 2593
- 92.) v. Hippel, P., McGhee, J. (1972) Ann. Rev. Biochem. 41, 231
- 93.) Chamberlin, M.J. (1974) Enzymes 10, 333
- 94.) Kosaganov, Y.N., Zarudnaja, M.J., Lazurkin, Y.S., Frank-Kamenetskii, M.D., Beabealashvily, R.S., Savochkina, L.P. (1971) Nature New Biology 231, 212
- 95.) Saucier, J.-M., Wang, J.C. (1972) Nature New Biology 239, 167
- 96.) Riley, P.A. (1970) Nature 228, 522
- 97.) Linn, S., Lehman, J.R. (1965) JBC 240, 1287
- 98.) Linn, S., Lehman, J.R. (1965) JBC 240, 1294
- 99.) Vogt, V.M. (1973) Eur. J. Biochem. 33, 192
- 100.) Johnson, P.H., Laskowski, M. (1970) JBC 245, 891
- 101.) Bartok, K., Garon, C.F., Bery, K.W., Fraser, M.J., Rose, J.A. (1974) JMB 87, 437
- 102.) Bartok, K., Denhardt, D.T. (1976) JBC 251, 530
- 103.) Kato, A.C., Fraser, M.J. (1973) Biochim. Biophys. Acta 312, 645
- 104.) Ranjit das Gupta, S. Mitra (1974) Biochim. Biophys. Acta 374, 145
- 105.) Rhodes, G., Chamberlin, M.J. (1974) JBC 249, 6675
- 106.) Naito, S., Ishihama, A. (1975) Biochim. Biophys. Acta 402, 88
- 107.) Portmann, R., Sogo, J.M., Koller, Th., Zillig, W. (1974) FEBS-Letters 45, 64

- 108.) Walter, C., Zillig, W., Palm, P., Fuchs, E. (1967)
Eur. J. Biochem. 3, 194
- 109.) Heyden, B., Nüsslein, C., Schaller, H. (1972) Nature
New Biology 240, 9
- 110.) Giacomoni, P.U., LeTalaer, J.Y., LePecq, J.B., (1974)
PNAS 71, 3091
- 111.) Pribnow, D. (1975) JMB 99, 419
- 112.) Novak, R.L. (1969) Biochim. Biophys. Acta 195, 279
- 113.) Kumar, S.A., Krakow, J.S. (1975) JBC 250, 2878
- 114.) Schäfer, R. (1973) Dissertation Universität München
- 115.) Chamberlin, M.J. (1974) Ann. Rev. Biochem. 43, 721
- 116.) Mangel, W.F., Chamberlin, M.J. (1974) JBC 249, 2995
- 117.) Schäfer, R., Zillig, W., Zechel, K. (1973) Eur. J.
Biochem. 33, 207
- 118.) Rabin, E.Z., Mustard, M., Fraser, M.J. (1968) Can. J.
Biochem. 46, 1285
- 119.) Rabin, E.Z., Tenenhouse, H., Fraser, J. (1972) Biochim.
Biophys. Acta 259, 50
- 120.) Tenenhouse, H., Fraser, M.J. (1973) Can. J. Biochem.
51, 469
- 121.) Shafranovskaya, N.N., Trifonov, E.N., Lazurkin, Y.S.,
Frank-Kamenetskii, M.D. (1973) Nature New Biology 241, 58
- 122.) Jacob, R.J., Lebowitz, J., Printz, M.P. (1974) Nucl. Acids
Research 1, 549
- 123.) Bick, M.D., Lee, C.S., Thomas jr., C.A. (1972) JMB 71, 1
- 124.) Wang, J.C. (1974) JMB 89, 783
- 125.) Mangel, W.F., Chamberlin, M.J. (1974) JBC 249, 3002
- 126.) Nishimura, S., Jones, D.S., Khorana, H.G. (1965) JMB
13, 302
- 127.) Maitra, U., Nakata, Y., Hurvitz, J. (1967) JBC 242 4908
- 128.) Riley, M., Maling, B., Chamberlin, M.J. (1966) JMB
20, 359
- 129.) Pilet, J., Blicharski, J., Brahms, J. (1975) Biochemistry
14, 1869

- 130.) Arnott, S., Selsing, E. (1974) JMB 88, 509
- 131.) Davies, D.R., Baldwin, R.L. (1963) JMB 6, 251
- 132.) Florentiev, V.L., Ivanov, V.J. (1970) Nature 228, 519
- 133.) Vinograd, J., Lebovitz, J., Watson, R. (1968) JMB 33, 173
- 134.) LeTalaer, J.Y., Jeanteur, Ph. (1971) PNAS 68, 3211
- 135.) Foss, H.M., Stahl, F.W. (1963) Genetics 48, 1659
- 136.) Maaloe, D., Hanawalt, P.C. (1961) JMB 3, 144
- 137.) Zillig, W., Zechel, K., Halbwachs, H.J. (1970) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 221
- 138.) Schaller, H., Nüsslein, C., Bonheoffer, F.J., Kurz, C., Nietschmann, J. (1972) Eur. J. Biochem. 26, 474
- 139.) Dische, Z. (1930) Mikrochemie 8, 4
- 140.) Heil, A., Zillig, W. (1970) FEBS-Letters 11, 105
- 141.) Honjo, T., Nishizuka, Y., Kato, J., Hayaishi, O. (1971) JBC 246, 4251
- 142.) Lämmli, U. (1970) Nature 227, 680

MEIN DANK GILT:

- Herrn Dr. H. J. Gross für die Überlassung von Oligonucleotiden bekannter Kettenlänge und verschiedenen Enzymen.
- Herrn Dr. H. Priess für die analytische Ultrazentrifugation.
- Fräulein H. Büger für die wertvolle Unterstützung bei verschiedenen Versuchen.
- Herrn Prof. H. Schaller für die Überlassung von DNA-Polymerase I.

Lebenslauf

- 18.3.1949 geboren in Friedrichshafen
- 1955-59 Besuch der Volksschule in Friedrichshafen
- 1959-67 Besuch des Graf Zeppelin-Gymnasiums in Friedrichshafen
- 1967-71 Studium der Physiologischen Chemie und Biochemie an der Universität Tübingen
- 1971-72 Studium der Chemie an der Universität München
- 1972-73 Fortsetzung des Biochemiestudiums an der Universität Tübingen
- 15.3.1973 Diplom-Prüfung in Physiologischer Chemie und Biochemie
Diplomarbeit bei Prof. J. Guglielmi über "4-Nitro-1-(β -D-2'-desoxy-ribofuranosyl)-imidazol: Untersuchung des UV-Bestrahlungsproduktes und dessen Hemmwirkung auf die DNA-abhängige RNA-Polymerase aus *E. coli*".
- 1973-76 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie unter Anleitung von Prof. W. Zillig.

Dissertationsdruck
GmbH & Co. KG.

Schadel & Wehle

8 München 40 Amalienstr. 81 Telefon 089/288 784/2. Etage

